

5

Kombinationstherapie zur Immunstimulation

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immunstimulation in einem Säugetier, wobei das Verfahren das Verabreichen einer mRNA, die für ein Antigen eines pathogenen Mikroorganismus kodiert, sowie das Verabreichen mindestens eines Cytokins, insbesondere GM-CSF, mindestens einer Cytokin-mRNA, 15 mindestens einer CpG DNA, mindestens einer adjuvo-viralen mRNA und/oder mindestens einer adjuvanten RNA umfasst.

Mit herkömmlichen Impfstoffen, die abgeschwächte oder inaktivierte Pathogene sowie weitere Substanzen, wie Zucker oder Proteinanteile, umfassen, können im 20 Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen befriedigende Ergebnisse erreicht werden. Jedoch ist es nicht möglich, mit solchen Impfstoffen einen ausreichenden Schutz gegen eine Vielzahl infektiöser Organismen, wie zum Beispiel HIV oder *Plasmodium Falciparum*, und insbesondere gegenüber Tumoren zu erzielen. Darüber hinaus besteht das Risiko, dass durch unerwünschte 25 Rekombinationsereignisse neue Pathogene auftreten (wie z.B. im Fall der SARS-Epidemie).

In der Therapie und Prävention zahlreicher Erkrankungen spielen daher molekularmedizinische Verfahren, wie die Gentherapie und die genetische 30 Vakzinierung, eine große Rolle. Basis dieser Verfahren ist die Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen bzw. Gewebe des Patienten, gefolgt von der Verarbeitung der durch die eingebrachten Nukleinsäuren kodierten Informationen, d.h. der

Expression der erwünschten Polypeptide bzw. Proteine. Als einzubringende Nukleinsäuren kommt hierbei sowohl DNA als auch RNA in Betracht.

Genetische Vakzinierungen, die aus der Injektion von nackter Plasmid-DNA
5 bestehen, wurden erstmals in den frühen 90iger Jahren an Mäusen demonstriert. Es stellte sich jedoch in Studien der klinischen Phasen I/II heraus, dass diese Technologie beim Menschen nicht die durch die Studien an Mäusen geweckten Erwartungen erfüllen konnte (6). Zahlreiche DNA-basierte genetische Vakzinierungen wurden seitdem entwickelt. In diesem Zusammenhang sind
10 verschiedene Verfahren zur Einbringung von DNA in Zellen, wie bspw. Calciumphosphat-Transfektion, Polyphen-Transfektion, Protoplasten-Fusion, Elektroporation, Mikroinjektion und Lipofektion, entwickelt worden, wobei sich insbesondere die Lipofektion als geeignetes Verfahren herausgestellt hat. Ebenfalls kommt die Verwendung von DNA-Viren als DNA-Vehikel in Betracht. Derartige
15 Viren erzielen aufgrund ihrer infektiösen Eigenschaften eine sehr hohe Transfektionsrate. Die verwendeten Viren werden bei diesem Verfahren genetisch verändert, damit in der transfizierten Zelle keine funktionsfähigen infektiösen Partikel gebildet werden. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahme kann jedoch, z.B. aufgrund möglicher Rekombinationsereignisse, ein Risiko der unkontrollierten
20 Ausbreitung der eingebrachten gentherapeutisch wirksamen sowie viralen Gene nicht ausgeschlossen werden. Daneben birgt die DNA-Vakzinierung weitere potentielle Sicherheitsrisiken (7, 8). Die injizierte rekombinante DNA muss zunächst den Zellkern erreichen, dieser Schritt kann bereits die Effizienz der DNA-Vakzinierung verringern. Im Zellkern besteht die Gefahr, dass die DNA in das
25 Wirtsgenom integriert. Die Integration von Fremd-DNA in das Wirtsgenom kann Einfluss auf die Expression der Wirtsgene haben und eventuell die Expression eines Onkogens oder die Zerstörung eines Tumorsuppressorgens auslösen. Ebenfalls kann ein für den Wirt essentielles Gen - und damit das Genprodukt - durch die Integration der Fremd-DNA in den kodierenden Bereich dieses Gens inaktiviert
30 werden. Eine besondere Gefahr besteht dann, wenn die Integration der DNA in ein

Gen erfolgt, das in die Regulation des Zellwachstums involviert ist. In diesem Fall kann die Wirtszelle in einen entarteten Zustand gelangen und zur Krebs- bzw. Tumorbildung führen.

- 5 Darüber hinaus ist es für die Expression einer in die Zelle eingebrachten DNA erforderlich, dass die entsprechenden DNA-Vehikel einen starken Promotor, wie den viralen CMV-Promotor, enthalten. Die Integration derartiger Promotoren in das Genom der behandelten Zelle kann zu unerwünschten Veränderungen der Regulierung der Genexpression in der Zelle führen. Ein weiterer Nachteil ist, dass
- 10 die DNA-Moleküle für lange Zeit im Zellkern verbleiben, entweder als Episom oder, wie erwähnt, in das Wirtsgenom integriert. Dies führt zu einer zeitlich nicht begrenzten bzw. nicht begrenzbaren Produktion des transgenen Proteins und zu der Gefahr einer damit verbundenen Toleranz gegenüber diesem transgenen Protein. Weiterhin kann durch die Injektion von DNA die Entwicklung von anti-DNA-
- 15 Antikörpern (9) und die Induktion von Autoimmunkrankheiten ausgelöst werden.

- Sämtliche dieser aufgezählten Risiken, die mit einer genetischen Vakzinierung verbunden sind, liegen nicht vor, wenn messenger RNA (mRNA) anstelle von DNA verwendet wird. Beispielsweise integriert mRNA nicht in das Wirtsgenom, bei der
- 20 Verwendung von RNA als Vakzine sind keine viralen Sequenzen, wie Promotoren etc., zur wirksamen Transkription erforderlich usw.. Zwar ist RNA gegenüber DNA weitaus instabiler (verantwortlich für die Instabilität der RNA sind insbesondere RNA-abbauende Enzyme, sog. RNasen (Ribonucleasen), aber auch zahlreiche weitere Prozesse, welche die RNA destabilisieren), jedoch sind im Stand der
- 25 Technik mittlerweile Verfahren zur Stabilisierung von RNA bekannt. So beispielsweise in WO 03/051401, WO 02/098443, WO 99/14346, EP-A-1 083232, US 5,580,859 und US 6,214,804. Es sind auch Methoden zum Schutz der RNA vor einer Degradierung durch Ribonukleasen entwickelt worden, die unter der Verwendung von Liposomen (15) oder einer intra-cytosolischen *in vivo*
- 30 Verabreichung der Nukleinsäure mit einer ballistischen Vorrichtung ("Gene gun")

erfolgen (16). Ebenfalls wurde eine *ex vivo* Methode vorgestellt, die sich auf die Transfektion von dendritischen Zellen bezieht (12).

Für eine RNA-basierte Vakzinierung wurden u.a. Immunisierungsstrategien entwickelt, die auf selbst-replizierender RNA basieren, die sowohl für ein Antigen als auch eine virale RNA Replikase kodieren (13, 14). Solche Verfahren sind zwar effizient, jedoch bestehen Sicherheitsrisiken bei der Verwendung von viralen RNA-Replikasen in genetischen Vakzinen (eine Rekombination zwischen der injizierten RNA und der endogenen RNA könnte zu der Bildung neuer Typen von alpha-Viren führen).

Insgesamt ist festzustellen, dass im Stand der Technik keine mRNA-Vakzine beschrieben wird, welche die Auslösung einer Immunantwort in dem Organismus, dem sie appliziert wird, sicherstellt, diese erhöht und dabei unerwünschte Nebenwirkungen weitestgehend vermeidet.

Ein weiterer großer Nachteil der im Stand der Technik bekannten mRNA-Vakzine besteht darin, dass durch eine mRNA-Vakzinierung lediglich eine humorale Immunantwort (Typ Th2) ausgelöst wird. Alle Viren und zahlreiche Bakterien, wie beispielsweise Mycobakterien und Parasiten, dringen jedoch in die Zellen ein, vermehren sich dort und sind so vor Antikörpern geschützt. Um daher insbesondere eine antitumorale oder antivirale Immunantwort hervorzurufen, ist die Auslösung einer zellulären Immunantwort (Typ Th1) erforderlich.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, ein neues System zur Gentherapie und genetischen Vakzinierung bereitzustellen, das eine effektivere Immunantwort und damit einen effektiveren Schutz insbesondere gegenüber intrazellulären Pathogenen und den durch diese Pathogene hervorgerufenen Erkrankungen oder auch gegenüber Tumoren gewährleistet.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Immunstimulation
5 in einem Säugetier, umfassend die folgenden Schritte:

- a. Verabreichen mindestens einer mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und
- b. Verabreichen mindestens einer Komponente ausgewählt aus der Gruppe,
10 bestehend aus mindestens einem Cytokin, mindestens einer Cytokin-mRNA, mindestens einer CpG DNA, mindestens einer adjuvo-viralen mRNA und mindestens einer adjuvanten RNA.

Nachfolgend wird die mRNA, die einen für mindestens ein Antigen aus einem
15 Pathogen oder mindestens ein Tumorantigen kodiert, als „erfindungsgemäße mRNA“ bezeichnet. Es handelt sich hierbei um die in Schritt (a.) des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte mRNA. Diese kann modifiziert oder nicht modifiziert vorliegen.

20 Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass die Injektion von nackter stabilisierter mRNA eine spezifische Immunantwort hervorruft (17). Erfindungsgemäß wurde eine solche antigen-spezifische Immunantwort näher untersucht, insbesondere im Vergleich zu einer DNA-induzierten Immunantwort. Hierzu wurde BALB/c-Mäusen in einem Versuchsansatz nackte, stabilisierte mRNA
25 und in einem anderen Versuchsansatz Plasmid-DNA in das Ohr injiziert. In beiden Versuchsansätzen enthielten die Nukleinsäuren einen für β -Galactosidase kodierenden Bereich. Im Ergebnis war festzustellen, dass im Fall der mRNA-Vakzinierung überwiegend IgG1-Antikörper produziert wurden, während bei der DNA-Vakzinierung überwiegend IgG2a-Antikörper gebildet wurden.
30 Erfindungsgemäß konnte damit nachgewiesen werden, dass mRNA-Vakzinierung

eine humorale Immunantwort (Th2) hervorruft (Produktion von IgG1), während DNA-Vakzinierung eine zelluläre Immunantwort (Th1) hervorruft (Produktion von IgG2a). Überraschenderweise konnte durch diese Untersuchung demnach auch festgestellt werden, dass die Entscheidung, ob in einem Säugetier, hier in Mäusen, eine humorale oder zelluläre Immunantwort ausgelöst wird, weder von dem Verabreichungsweg noch von dem Antigen, das durch die Nukleinsäure kodiert wird, abhängig ist, sondern vielmehr von der Art der Nukleinsäure, RNA oder DNA. In weiteren Versuchsansätzen wurden Nukleinsäuren verwendet, die anstelle des β -Galactosidase kodierenden Bereichs einen Bereich enthielten, der für ein Antigen eines Pathogens oder eines Tumorantigens kodierte. Auf solche Antigen kodierenden Bereiche wird nachfolgend näher eingegangen. In diesen Versuchsansätzen zeigten sich ebenfalls die vorangehend beschriebenen Resultate bezüglich der Auslösung einer Th1 - bzw. Th2-Immunantwort. Die Dosierung der erfindungsgemäßen mRNA hängt insbesondere von der zu behandelnden Erkrankung und deren Fortschrittsstadium, wie auch dem Körpergewicht, dem Alter und dem Geschlecht des Patienten ab (Die Begriffe Organismus, Säugetier, Mensch, Patient werden im Sinne der Erfindung synonym verwendet). Die Konzentration der erfindungsgemäßen mRNA kann daher innerhalb eines Bereichs von ungefähr 1 μ g bis 100 mg/ml variieren.

Darüber hinaus wurde erfindungsgemäß erkannt, dass besonders vorteilhafte Eigenschaften sich dann einstellen, wenn die erfindungsgemäße mRNA in Kombination mit mindestens einer Komponente mindestens einer der folgenden Kategorien, nämlich Cytokin, Cytokin-mRNA, CpG DNA, adjuvo-virale mRNA und/oder adjuvante RNA, verabreicht wird. Komponenten der vorgenannten Kategorien haben Adjuvanzeigenschaften, wie erfindungsgemäß festgestellt, so dass die unter diese Kategorien fallenden Verbindungen oder Komponenten als Adjuvant zu betrachten sind. Diese Adjuvanzeigenschaften beruhen auf der Wirkung der Verbindungen der vorgenannten Kategorien, immunstimulatorisch zu wirken. Komponenten aus den Kategorien der Cytokine oder Cytokin-

exprimierenden Cytokin-mRNAs sind als solche bereits unmittelbar immunstimulatorisch wirksam. Verbindungen der anderen vorgenannten Kategorien können mittelbar immunstimulatorisch dadurch wirken, dass sie die Cytokin-Sekretion im behandelten Lebewesen (human oder Tier, insbesondere Haustieren) stimulieren.

Entsprechend haben die Erfinder den Einfluss von Cytokinen auf RNA-Vakzinierung untersucht. Cytokine stellen im Zusammenhang mit DNA-Vakzinierungen - wie aus dem Stand der Technik bekannt - ein hervorragendes Adjuvanz dar (19,20,24,25). Ein bevorzugtes Cytokin ist GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), das die Dichte der Dendritischen Zellen (dendritic cells; DCs) in der Haut erhöht und damit eine durch eine DNA-Vakzinierung hervorgerufene Immunantwort verstärkt. Ziel der erfindungsgemäßen Untersuchungen war es, durch Cytokin-Verabreichung auch eine erfindungsgemäße mRNA-induzierte Immunantwort noch weiter zu verstärken. Die Verabreichung von Cytokinen in Verbindung mit Peptiden (26) und DNA (27) ist im Stand der Technik bekannt. Allerdings konnten zum einen bislang keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden, vermutlich (auch) dadurch, dass ein geeigneter Zeitpunkt für die Verabreichung von GM-CSF nicht festgelegt werden konnte, zum anderen sind Vakzinierungen, die mit Peptiden bzw. DNA durchgeführt werden, nicht auf RNA-basierten Vakzinierungen übertragbar. Hierauf wurde vorstehend bereits detailliert eingegangen.

Erfindungsgemäß wurden parallele Versuche durchgeführt, in denen die Zugabe eines Cytokins in Proteinform, bevorzugt eine GM-CSF-Zugabe, zu verschiedenen Zeitpunkten vor, nach und gleichzeitig mit einer mRNA-Vakzinierung (wobei die (erfindungsgemäße) mRNA für β -Galactosidase, ein Antigen eines Pathogens oder ein tumorantigen kodierte) erfolgte. Im Ergebnis blieb festzustellen, dass eine Verabreichung vor der Vakzinierung keinen wesentlichen Effekt auf Qualität oder Quantität (Typ und Menge des produzierten Immunglobulins IgG1/IgG2a) ausübte

(siehe Figur 3 für β -Galactosidase). Überraschenderweise konnte erfindungsgemäß jedoch festgestellt werden, dass bei Verabreichung von einem Cytokin, bevorzugt GM-CSF, nach der mRNA-Vakzinierung, nicht nur eine erhöhte Th2-Immunantwort vorlag, sondern darüber hinaus auch eine Th1-Immunantwort induziert wurde
5 (siehe Figur 3 und Tabelle 1). Besonders gute Ergebnisse ergaben sich bei der Verabreichung von einem Cytokin, bevorzugt GM-CSF, vorzugsweise ungefähr 24 Stunden nach der Verabreichung der erfindungsgemäßen mRNA.

Darüber hinaus wurden auch entsprechende Versuche durchgeführt, in denen statt
10 des Cytokins in Proteinform die Zugabe einer Cytokin-mRNA (d.h. einer mRNA, die den kodierenden Bereich für ein funktionelles Cytokin, ein Fragment oder eine Variante desselben enthält), bevorzugt eine G-CSF, M-CSF oder GM-CSF-mRNA-Zugabe, zu verschiedenen Zeitpunkten vor, nach und gleichzeitig mit einer mRNA-Vakzinierung (wobei die (erfindungsgemäße) mRNA für β -Galactosidase kodierte)
15 erfolgte. Das Ergebnis der Verabreichung, ausgedrückt durch die Sekretion eines Cytokins (IFN- γ) kann aus Figur 5 entnommen werden. Überraschenderweise konnte erfindungsgemäß auch hier festgestellt werden, dass bei Verabreichung von Cytokin-mRNA, bevorzugt GM-CSF-mRNA, vor, gleichzeitig und nach der mRNA-Vakzinierung eine starke Erhöhung der IFN- γ -Sekretion erfolgt, wodurch eine
20 mittelbar immunstimulatorische Wirkung hervorgerufen wird. Besonders gute Ergebnisse ergaben sich insbesondere bei der Verabreichung von Cytokin-mRNA, bevorzugt GM-CSF-mRNA, vorzugsweise ungefähr 24 Stunden nach der Verabreichung der erfindungsgemäßen mRNA.

25 Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Verabreichung von CpG DNA vor, nach und gleichzeitig mit der vorangehend beschriebenen mRNA-Vakzinierung erreicht. CpG stellt in der DNA eine relativ seltene Dinukleotidfolge dar, bei der der Cytosinrest häufig methyliert ist, so dass 5-Methylcytosin vorliegt. Die Methylierung des Cytosinrestes hat Auswirkungen auf die Genregulation, wie z.B. die Hemmung
30 der Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Blockade von Promotorstellen usw.).

D.h., auch hier lag nicht nur eine erhöhte Th2-Immunantwort vor, sondern darüber hinaus wurde eine Th1-Immunantwort induziert. Auch hier wurden besonders gute Ergebnisse erzielt, wenn die CpG DNA ungefähr 24 Stunden nach der Verabreichung der erfindungsgemäßen mRNA verabreicht wurde. Insbesondere wurde CpG DNA mit dem Motiv CpG DNA 1668 mit der Sequenz 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' oder dem Motiv CpG 1982 5'-TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT-3' in den Versuchen verwendet.

Auch die Verabreichung von adjuvo-viraler mRNA vermag einen immunstimulatorischen Effekt auszulösen. In diesem Fall wird ebenfalls eine Cytokin-Ausschüttung herbeigeführt. Als Beispiele für derartige adjuvo-virale mRNAs wären mRNAs zu nennen, die für das Influenza-Matrixprotein oder das HBS-Oberflächenprotein codieren. Insgesamt kommen typischerweise für eine adjuvante Wirkung einer adjuvo-viralen mRNA solche Antigene in Betracht, die virale Matrix- oder Oberflächenproteine darstellen.

Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Verabreichung von adjuvanter RNA vor, nach und gleichzeitig mit der vorangehend beschriebenen mRNA-Vakzinierung erreicht. Bei der adjuvanten RNA handelt es sich um relativ kurze RNA-Moleküle, die bspw. aus etwa 2 bis etwa 1.000 Nukleotiden, vorzugsweise aus etwa 8 bis etwa 200 Nukleotiden, besonders bevorzugt aus 15 bis etwa 31 Nukleotiden, bestehen. Erfindungsgemäß kann die adjuvante RNA ebenfalls einzel- oder doppelsträngig vorliegen. Dabei kann insbesondere doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21 Nucleotiden auch als Interferenz-RNA eingesetzt werden, um spezifisch Gene, z.B. von Tumorzellen, auszuschalten, und so diese Zellen gezielt abzutöten oder um darin aktive, für eine maligne Entartung verantwortlich zu machende Gene zu inaktivieren (Elbashir et al., Nature 2001, 411, 494-498). Die adjuvante RNA wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren in Schritt (b.) eingesetzt und ist bevorzugt chemisch modifiziert, wie nachfolgend im Zusammenhang mit Modifikationen offenbart. Die adjuvante RNA aktiviert Zellen des Immunsystems (vornehmlich

10

Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere dendritische Zellen (DC), sowie die Abwehrzellen, bspw. in Form von T-Zellen), besonders stark und stimuliert so das Immunsystem eines Organismus. Die adjuvante RNA führt hierbei insbesondere zu einer vermehrten Freisetzung von immunsteuernden Cytokinen, bspw.

5 Interleukinen, wie IL-6, IL-12 usw..

Die Dosierung des Cytokins bzw. der Cytokin-mRNA bzw. der CpG DNA bzw. der adjuvo-viralen mRNA bzw. der adjuvanten RNA ist abhängig von der verwendeten erfindungsgemäßen mRNA, die einen für ein Antigen aus einem Pathogen oder

10 einem Tumorantigen kodierenden Bereich enthält, der zu behandelnden Erkrankung, dem Zustand des zu behandelnden Patienten (Gewicht, Größe, Entwicklungsstatus der Erkrankung etc.). Die Dosierungsbandbreite liegt ungefähr in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 300 µg/m².

15 „Vakzinierung“ bzw. „Impfung“ bedeutet im allgemeinen die Einbringung eines oder mehrerer Antigene oder im Sinne der Erfindung die Einbringung der genetischen Information für ein oder mehrere Antigen(e) in Form der für das/die Antigen(e) kodierenden erfindungsgemäßen mRNA in einen Organismus, insbesondere in eine/mehrere Zelle/Zellen bzw. Gewebe dieses Organismus. Die so

20 verabreichte erfindungsgemäße mRNA wird in dem Organismus bzw. in dessen Zellen in das Antigen translatiert, d.h. das von der erfindungsgemäßen mRNA kodierte Antigen (auch: antigenes Polypeptid oder antigenes Peptid) wird exprimiert, wodurch eine gegen dieses Antigen gerichtete Immunantwort stimuliert wird.

25 Eine „Immunstimulation“ oder „Stimulierung einer Immunantwort“ erfolgt in der Regel durch die Infektion eines fremden Organismus (z.B. einem Säugetier, insbesondere einem Mensch) mit einem Pathogen (oder auch pathogenen Organismus). Von einem „Pathogen“ oder „pathogenen Organismus“ im Sinne der Erfindung sind insbesondere Viren und Bakterien, jedoch auch alle anderen

30 Pathogene (wie z.B. Pilze oder infektiösausslösende Organismen, wie

Trypanosomen, Nematoden etc.) umfasst. „Antigene“ eines Pathogens sind Substanzen (z.B. Proteine, Peptide, Nukleinsäuren oder Fragmente hiervon) des Pathogens, die in der Lage sind, die Bildung von Antikörpern auszulösen. Ebenfalls umfasst von der Erfindung sind Antigene aus einem Tumor. Hierunter ist zu
5 verstehen, dass das Antigen in mit einem Tumor assoziierten Zellen exprimiert wird. Antigene aus Tumoren sind insbesondere solche, die in den entarteten Zellen selbst produziert werden. Vorzugsweise handelt es sich dabei um auf der Oberfläche der Zellen lokalisierte Antigene. Des Weiteren sind die Antigene aus Tumoren aber auch solche, die in Zellen exprimiert werden, welche nicht selbst (oder ursprünglich
10 nicht selbst) entartet sind (waren), jedoch mit dem in Rede stehenden Tumor assoziiert sind. Dazu gehören bspw. auch Antigene, die mit Tumor-versorgenden Gefäßen bzw. deren (Neu-)Bildung zusammenhängen, insbesondere solche Antigene, die mit der Neovaskularisierung oder Angiogenese assoziiert sind, bspw. Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF, usw.. Weiterhin umfassen derartige mit einem
15 Tumor zusammenhängende Antigene solche aus Zellen des den Tumor einbettenden Gewebes.

Unter einem „Cytokin“ ist ganz allgemein ein Protein zu verstehen, das das Verhalten von Zellen beeinflusst. Die Wirkung von Cytokinen erfolgt über
20 spezifische Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Zu den Cytokinen gehören beispielsweise Monokine, Lymphokine oder auch Interleukine, Interferone, Immunglobuline und Chemokine. Besonders bevorzugt wird erfindungsgemäß als Cytokin GM-CSF oder G-CSF oder M-CSF.

25 „Verabreichen“ der/des erfindungsgemäßen mRNA und des Cytokins bzw. der Cytokin-mRNA bzw. der adjuvo-viralen mRNA bzw. der CpG DNA bzw. der adjuvanten RNA bedeutet, dem zu behandelnden Organismus, vorzugsweise Säugetier, besonders bevorzugt Mensch, eine geeignete Dosis der erfindungsgemäßen mRNA bzw. des Cytokins bzw. der Cytokin-mRNA bzw. der
30 adjuvo-viralen mRNA bzw. der CpG DNA bzw. der adjuvanten RNA zuzuführen.

Die Verabreichung kann auf jede geeignete Weise erfolgen, vorzugsweise über eine Injektion, parenteral, bspw. intravenös, intraarteriell, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal oder intradermal. Ebenso ist eine topische oder orale Verabreichung möglich. Auf die Dosierung der erfindungsgemäßen mRNA bzw. des Cytokins bzw. 5 der Cytokin-mRNA bzw. der adjuvo-viralen mRNA bzw. der CpG DNA bzw. der adjuvanten RNA wurde bereits oben näher eingegangen. Typischerweise liegt die verabreichte erfindungsgemäße mRNA oder das Adjuvans gemäß Verfahrensschritt (b.) in flüssiger Form vor, typischerweise in wässriger Lösung, die gepuffert sein kann, bspw. mit Phosphatpuffer, HEPES, Citrat, Acetat etc., bspw. auf einen pH- 10 Wert zw. 5,0 und 8,0, insbesondere 6,5 und 7,5, und weitere vorteilhafte Arzneimittelhilfs- und -Zusatzstoffe (bspw. humanes Serumalbumin, Polysorbat 80, Zucker etc.) oder auch Salze, bspw. NaCl, KCl etc. enthalten kann.

Konsequenterweise ist von der vorliegenden Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur 15 Behandlung von Erkrankungen, insbesondere von Krebs- bzw. Tumorerkrankungen sowie von viralen und bakteriellen Infektionen, wie beispielsweise Hepatitis B, HIV oder MDR (multi-drug resistance)-Infektionen bzw. eine Vakzinierung zur Prävention der vorstehend genannten Erkrankungen umfasst, welches das Verabreichen der erfindungsgemäßen mRNA und mindestens einer Komponente der 20 nachfolgenden Kategorien Cytokin, Cytokin-mRNA, adjuvo-virale mRNA, CpG DNA und/oder adjuvante RNA an ein Lebewesen oder an einen Patienten, insbesondere einen Menschen oder ein Haustier, umfasst. Hierbei handelt es sich um eine Kombinationstherapie, bei der erfindungsgemäße mRNA und Cytokin bzw. Cytokin-mRNA bzw. adjuvo-virale mRNA bzw. CpG DNA bzw. adjuvante RNA 25 erfindungsgemäß gemeinsam (in einem Gemisch), getrennt und zeitgleich oder getrennt und zeitlich abgestuft verabreicht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die/das erfindungsgemäße mRNA und Cytokin bzw. Cytokin-mRNA bzw. adjuvo- 30 virale mRNA bzw. CpG DNA bzw. der adjuvante RNA getrennt bzw. zeitlich

- abgestuft verabreicht. Hierbei wird in einer besonders bevorzugten Ausführungsform in dem erfindungsgemäßen Verfahren der Schritt b. 1 Minute bis 48 Stunden, bevorzugt 20 Minuten bis 36 Stunden, ebenfalls bevorzugt 30 Minuten bis 24 Stunden, stärker bevorzugt 10 Stunden bis 30 Stunden, am stärksten bevorzugt 12 Stunden bis 28 Stunden, insbesondere bevorzugt 20 bis 26 Stunden, nach Schritt a. vorgenommen. Erfindungsgemäß kann das/die Cytokin bzw. die Cytokin-mRNA bzw. adjuvo-virale mRNA bzw. die CpG DNA bzw. die adjuvante RNA aber auch vor oder gleichzeitig mit der erfindungsgemäßen mRNA verabreicht werden.
- 10 Insbesondere können die gemäß Verfahrensschritt b. einsetzbaren Substanzen auch in jeder beliebigen Kombination verabreicht werden, d.h. es können erfindungsgemäß bspw. eine Cytokin-mRNA mit einer adjuvanten RNA und/oder einer CpG DNA in einem Gemisch verabreicht werden. Sollte die Kombination der Komponenten gemäß Verfahrensschritt b. nicht in einem Gemisch erfolgen,
- 15 können die miteinander kombinierten Komponenten auch separiert gemäß Verfahrensschritt b. verabreicht werden. Bevorzugt ist es auch, im Verfahrensschritt b. zwei oder mehr, vorzugsweise 2-4, Komponenten derselben Kategorie, bspw. mindestens zwei verschiedene Cytokine oder mindestens zwei verschiedene Cytokin-mRNAs miteinander, ggf. auch, wie oben offenbart, mit Komponenten
- 20 weiterer Kategorien, zu kombinierten (im Gemisch oder getrennt).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren in Schritt a. und/oder b. zusätzlich mindestens ein RNase-Inhibitor, vorzugsweise RNAsin oder Aurintricarbonsäure verabreicht. Dies dient dazu, einem

25 Abbau der DNA durch RNasen (RNA-abbauende Enzyme) vorzubeugen. Ein derartiger Inhibitor wird typischerweise in die mindestens eine gemäß Verfahrensschritt (b.) verabreichte Zusammensetzung eingearbeitet.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren

30 eine Immunantwort auf einer erfindungsgemäße mRNA verstärkt bzw. moduliert,

besonders bevorzugt von einer Th2-Immunantwort in eine Th1-Immunantwort verändert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die mindestens eine
 5 erfindungsgemäße mRNA aus Schritt (a.) des erfindungsgemäßen Verfahrens einen
 Bereich, der für mindestens ein Antigen aus einem Tumor ausgewählt aus der
 Gruppe, bestehend aus 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, -Catenin/m, Bcr-abl, CAMEL,
 CAP-I, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CMV pp65, CT, Cyp-B, DAM, EGFR1,
 ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gpl oo, HAGE, HBS, HER-2/neu, HLA-
 10 A*0201-R1 70I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (oder hTRT), Influenza Matrix-
 Protein, insbesondere Influenza A-Matrix-M1 -Protein oder Influenza B-Matrix-M1 -
 Protein, iCE, K1AA0205, LAGE, z.B. LAGE-I, LDLR/FUT, MAGE, z.B. MAGE-A,
 MAGE-B, MAGE-C, MAGE-A1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-10, MART-
 1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-I, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-I, p190
 15 minor bcr-abl, Pml/RAR, PRAME, Proteinase 3, PSA, PSM, PTPRZ1, RAGE, RU1
 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, SEC61G, SOX9, SPC1, SSX, Survivin.
 TEL/AML1, TERT, TNC, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, Tyrosinase und VVT1
 kodiert.

20 Besonders bevorzugt enthält die mindestens eine erfindungsgemäße mRNA einen
 Bereich, der für mindestens ein Antigen aus einem Tumor sind ausgewählt aus der
 Gruppe bestehend aus MAGE-A1 [Accession number (Zugriffsnummer) M77481],
 MAGE-A6 [Accession number NM_005363], Melan-A [Accession number
 NM_005511], GP100 [Accession number M77348], Tyrosinase [Accession number
 25 NM_000372], Survivin [Accession number AF077350], CEA [Accession number
 NM_004363], Her-2/neu [Accession number M11730], Mucin-1 [Accession
 number NM_002456], TERT [Accession number NM_003219], PR3 [Accession
 number NM_002777], VVT1 [Accession number NM_000378], PRAME [Accession
 number NM_006115], TNC (Tenascin C) [Accession number X78565], EGFR1
 30 („Epidermal Growth Factor Receptor 1“) [Accession number AF288738], SOX9

[Accession number Z46629], SEC61 G [Accession number NM_01 4302], PTPRZ1 (Protein Tyrosine Phosphatase, Rezeptor-Typ, Z-Polypeptid 1) [Accession number NM_002851], CMV pp65 [Accession number M 15120], HBS-Antigen [Accession number E00121], Influenza A-Matrix-M1 -Protein Accession number AF3481 97 und
5 Influenza B-Matrix-M1 -Protein Accession number V01 099 kodiert.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung enthält die Cytokin-mRNA einen Abschnitt, der für das Cytokin kodiert bzw. die adjuvo-virale mRNA einen Abschnitt, der für ein virales Protein mit adjuvanter Wirkung kodiert. Allerdings kann auch in diesem Fall
10 (wie auch im Fall der erfindungsgemäßen mRNA) die eingesetzte und hier als Cytokin-mRNA bzw. adjuvo-virale mRNA bezeichnete Nukleotidsequenz neben dem kodierenden Abschnitt mindestens einen weiteren funktionellen Abschnitt enthalten, bspw. spezifische Signal- oder Regulationsabschnitte. Diese Signal- oder Regulationsabschnitte dienen bspw. zur besseren Translation der i. S. dieser
15 Erfindung verabreichten mRNA (bspw. in einem 3'-terminalen, nicht-translatierten Bereich der mRNA). Allerdings kann ein Signal- oder Regulationsabschnitt auch im codierenden Bereich der mRNA, bspw. 3'- oder 5'-terminalen Bereich der codierenden Sequenz vorgesehen sein, so dass die Signal- oder Regulationswirkung erst auf der Ebene des exprimierten (Fusions)proteins auftritt. So könnte bspw. im
20 codierenden Bereich der mRNA eine Signalpeptidsequenz (bspw. eine leader-Sequenz) mitexprimiert werden, die - nach Verabreichung, Zelleintritt und Expression - zu einer gezielten Sekretion des durch die verabreichte mRNA (erfindungsgemäße mRNA oder eine mRNA mit adjuvanter Wirkung aus Verfahrensschritt (b.)) codierten Proteins aus der Zelle führt. Bspw. können als
25 Sekretionssignale die Sekretionssignalpeptide entsprechender Peptid- oder Protein hormone (z.B. von Insulin, Vasopressin, Glukagon etc.) oder bspw. auch die Sekretionssignale von Antikörpern eingesetzt werden, indem die mRNA deren jeweilige Nukleotidsequenz enthält.

Erfindungsgemäß sind ebenfalls funktionelle Fragmente und/oder funktionelle Varianten einer erfindungsgemäßen mRNA bzw. eines Antigens bzw. eines Cytokins bzw. einer Cytokin-mRNA bzw. einer adjuvo-viralen mRNA bzw. einer CpG DNA bzw. einer adjuvanten RNA der Erfindung mit umfasst. „Funktionell“ im Sinne der

5 Erfindung bedeutet, dass das Antigen bzw. die erfindungsgemäße mRNA immunologische bzw. immunogene Aktivität aufweist, insbesondere eine Immunantwort in einem Organismus, in dem es fremd ist, auslöst. Die erfindungsgemäße mRNA ist funktionell, wenn sie in ein funktionelles Antigen (oder ein Fragment hiervon) translatiert werden kann.

10

Unter einem „Fragment“ im Sinne der Erfindung ist ein verkürztes Antigen bzw. eine verkürzte mRNA bzw. ein verkürztes Cytokin bzw. eine verkürzte Cytokin-mRNA bzw. eine adjuvo-virale mRNA bzw. eine verkürzte CpG DNA bzw. eine verkürzte adjuvante RNA der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Es kann sich hierbei um

15 N-terminal, C-terminal oder intrasequentiell verkürzte Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzen handeln.

Die Herstellung erfindungsgemäßer Fragmente ist im Stand der Technik gut bekannt und kann von einem Fachmann unter Anwendung von Standardverfahren

20 durchgeführt werden (siehe z.B. Maniatis et al. (2001), Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Im allgemeinen kann die Herstellung der erfindungsgemäßen Fragmente durch Modifizieren der DNA-Sequenz, die das Wildtyp-Molekül kodiert, gefolgt von einer Transformation dieser DNA-Sequenz in einen geeigneten Wirt und Expression dieser modifizierten DNA-

25 Sequenz, unter der Voraussetzung, dass die Modifikation der DNA die beschriebenen funktionellen Aktivitäten nicht zerstört, durchgeführt werden. Im Falle der erfindungsgemäßen mRNA oder einer Cytokin-mRNA oder einer adjuvo-viralen mRNA kann die Herstellung des Fragments ebenfalls durch Modifizieren der Wildtyp-DNA-Sequenz gefolgt von einer *in vitro* Transkription und Isolierung der

30 mRNA erfolgen, ebenfalls unter der Voraussetzung, dass die Modifikation der DNA

die funktionelle Aktivität der jeweiligen mRNA nicht zerstört. Die Identifizierung eines erfindungsgemäßen Fragments kann beispielsweise über eine Sequenzierung des Fragments und einem nachfolgenden Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Wildtyp-Sequenz erfolgen. Die Sequenzierung kann anhand von Standardverfahren,
5 die im Stand der Technik zahlreich und gut bekannt sind, erfolgen.

Als „Varianten“ im Sinne der Erfindung werden insbesondere solche erfindungsgemäßen mRNAs bzw. Cytokine bzw. Cytokin-mRNAs adjuvo-virale mRNAs bezeichnet, die Sequenzunterschiede zu den entsprechenden Wildtyp-
10 Sequenzen aufweisen. Bei diesen Sequenzabweichungen kann es sich um eine oder mehrere Insertion(en), Deletion(en) und/oder Substitution(en) von Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren handeln, wobei eine Sequenzhomologie von mindestens 60%, bevorzugt 70%, stärker bevorzugt 80%, ebenfalls stärker bevorzugt 85%, noch stärker bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 97% vorliegt.

15

Um die prozentuale Identität zweier Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen zu bestimmen, können die Sequenzen abgeglichen werden, um nachfolgend miteinander verglichen zu werden. Hierfür können z.B. Lücken in die Sequenz der ersten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenz eingeführt werden und die
20 Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren an der entsprechenden Position der zweiten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenz verglichen werden. Wenn eine Position in der ersten Aminosäuresequenz mit der gleichen Aminosäure bzw. der gleichen Nukleinsäure besetzt ist, wie es an einer Position in der zweiten Sequenz der Fall ist, dann sind beide Sequenzen an dieser Position identisch. Die prozentuale
25 Identität zwischen zwei Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl identischer Positionen geteilt durch die Sequenzen.

Die Bestimmung der prozentualen Identität zweier Sequenzen kann anhand eines mathematischen Algorithmus durchgeführt werden. Ein bevorzugtes, jedoch nicht
30 beschränkendes, Beispiel eines mathematischen Algorithmus, der für den Vergleich

zweier Sequenzen herangezogen werden kann, ist der Algorithmus von Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Ein solcher Algorithmus ist in dem NBLAST-Programm integriert, mit dem Sequenzen identifiziert werden können, die eine gewünschte Identität zu den Sequenzen der vorliegenden Erfindung besitzen. Um
5 einen Lücken-Abgleich (auch "gapped alignment"), wie oben beschrieben, zu erhalten, kann das "Gapped BLAST"-Programm verwendet werden, wie in Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 beschrieben.

Funktionelle Varianten im Sinne der Erfindung, können vorzugsweise
10 erfindungsgemäße mRNA-Moleküle, Cytokin-mRNA- oder adjuvo-virale mRNA-Moleküle sein, die eine erhöhte Stabilität und/oder Translationsrate gegenüber ihren Wildtyp-Molekülen aufweisen. Ebenfalls kann ein besserer Transport in die Zelle des (Wirts-)Organismus vorliegen.

15 Unter den Begriff Varianten fallen insbesondere solche Aminosäuresequenzen, die gegenüber den physiologischen Sequenzen konservative Substitution aufweisen. Als konservative Substitutionen werden solche Substitutionen bezeichnet, bei denen Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht werden, die aus der gleichen Klasse stammen. Insbesondere gibt es Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, positiv
20 oder negativ geladenen Seitenketten, aromatischen Gruppen in der Seitenketten oder Aminosäuren, deren Seitenketten Wasserstoffbrücken eingehen können, bspw. Seitenketten, die eine Hydroxyfunktion besitzen. Das bedeutet, dass bspw. eine Aminosäure mit einer polaren Seitenkette durch eine andere Aminosäure mit einer gleichfalls polaren Seitenkette ersetzt wird oder beispielsweise eine durch eine
25 hydrophobe Seitenkette gekennzeichnete Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit gleichfalls hydrophober Seitenkette substituiert wird (z.B. Serin (Threonin) durch Threonin (Serin) bzw. Leucin (Isoleucin) durch Isoleucin (Leucin)). Insertionen und Substitutionen sind insbesondere an solchen Sequenzpositionen möglich, die keine Veränderung der dreidimensionalen Struktur hervorrufen oder
30 den Bindungsbereich betreffen. Eine Veränderung einer dreidimensionalen Struktur

durch Insertion(en) oder Deletion(en) ist bspw. mit Hilfe von CD-Spektren (Zirkulardichroismus-Spektren) leicht überprüfbar (Urry, 1985, Absorption, circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (Hrsgb.), Elsevier, Amsterdam).

5

Ebenfalls umfasst sind Varianten, bei denen ein „codon usage“ erfolgt. Jede Aminosäure wird durch ein Codon, das durch jeweils drei Nukleotide (Triplett) definiert wird, kodiert. Es ist möglich, ein Codon, das eine bestimmte Aminosäure kodiert, gegen ein anderes Codon, das dieselbe Aminosäure kodiert, auszutauschen.

- 10 Durch die Wahl geeigneter alternativer Codons kann beispielsweise die Stabilität der erfindungsgemäßen mRNA erhöht werden. Hierauf wird nachstehend noch näher eingegangen.

- Geeignete Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Varianten mit
15 Aminosäuresequenzen, die gegenüber den Wildtyp-Sequenzen Substitutionen aufweisen, werden bspw. in den Druckschriften US 4,737,462, US 4,588,585, US 4,959,314, US 5,116,943, US 4,879,111 und US 5,017,691 offenbart. Die Herstellung von Varianten im allgemeinen wird insbesondere auch von Maniatis et al, (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory
20 Press) beschrieben. Es können hierbei Codons weggelassen, ergänzt oder ausgetauscht werden. Varianten im Sinne der Erfindung können ebenfalls hergestellt werden, indem in die Nukleinsäuren, welche für die Varianten kodieren, Veränderungen eingeführt werden, wie bspw. Insertionen, Deletionen und/oder Substitutionen einer oder mehrerer Nukleotide. Im Stand der Technik sind
25 zahlreiche Verfahren für derartige Veränderungen von Nukleinsäuresequenzen bekannt. Eine der am meisten verwendeten Techniken ist die Oligonukleotid-gerichtete Orts-spezifische Mutagenese (siehe Comack B., Current Protocols in Molecular Biology, 8.01-8.5.9, Ausubel F. et al., Aufl. 1991). Bei dieser Technik wird ein Oligonukleotid synthetisiert, dessen Sequenz eine bestimmte Mutation
30 aufweist. Dieses Oligonukleotid wird dann mit einem Template hybridisiert, das die

Wildtyp-Nukleinsäuresequenz enthält. Bevorzugt wird bei dieser Technik ein einzelsträngiges Template verwendet. Nach dem Annealing von Oligonukleotid und Template, wird eine DNA-abhängige DNA-Polymerase eingesetzt, um den zweiten Strang des Oligonukleotids, der komplementär zu dem Template-DNA-Strang ist, zu synthetisieren. Als Ergebnis wird ein Heteroduplex-Molekül erhalten, welches eine Fehlpaarung enthält, die durch die oben erwähnte Mutation in dem Oligonukleotid entsteht. Die Oligonukleotidsequenz wird in ein geeignetes Plasmid eingeführt, dieses wird in eine Wirtszelle eingeführt und in dieser Wirtszelle wird die Oligonukleotid-DNA repliziert. Mit dieser Technik erhält man Nukleinsäuresequenzen mit gezielten Veränderungen (Mutationen), welche für die Herstellung von Varianten gemäß der Erfindung verwendet werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das mindestens eine Cytokin (aus der Cytokin-Kategorie) ausgewählt aus der Gruppe, die aus IL-1 (α/β), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , LT- α , MCAF, RANTES, TGF α , TGF β 1, TGF β 2, TNF α , TNF β und besonders bevorzugt G-CSF, M-CSF oder GM-CSF besteht, insbesondere (rekombinante oder nicht-rekombinante) der humanen Formen der vorgenannten Cytokine, ebenso wie deren Varianten oder Fragmenten. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird in einem Verfahrensschritt b. Cytokin-mRNA, die für eines der vorgenannten Cytokine, deren Fragmente oder Varianten, codiert bzw. entsprechende codierende Abschnitte enthält, eingesetzt.

Die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) (d.h. die erfindungsgemäße, die Cytokin- oder die adjuvo-virale mRNA) oder die adjuvante RNA aus Schritt (b.) des Verfahrens gemäß der Erfindung kann als nackte (m)RNA oder komplexiert mit weiteren Komponenten vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) bzw. die adjuvante RNA aus Schritt (b.) des erfindungsgemäßen

Verfahrens als modifizierte (m)RNA, insbesondere stabilisierte (m)RNA, vor. Modifikationen der erfindungsgemäßen mRNA bzw. der (m)RNA aus Schritt (b.) dienen hierbei vor allem der Erhöhung der Stabilität der erfindungsgemäßen mRNA bzw. der (m)RNA aus Schritt (b.) aber auch der Verbesserung des Transfers der

5 erfindungsgemäßen mRNA bzw. der (m)RNA aus Schritt (b.) (d.h. der Cytokin-mRNA, der adjuvo-viralen mRNA und der adjuvanten RNA) in eine Zelle bzw. ein Gewebe eines Organismus. Vorzugsweise weist die erfindungsgemäße mRNA bzw. die (m)RNA aus Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens eine oder mehrere Modifikationen, insbesondere chemische Modifikationen, auf, die zur Erhöhung der

10 Halbwertszeit der erfindungsgemäßen mRNA bzw. der (m)RNA aus Schritt (b.) im Organismus beitragen bzw. den Transfer der erfindungsgemäßen mRNA bzw. der (m)RNA aus Schritt (b.) in die Zelle bzw. ein Gewebe verbessern.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der

15 G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA aus Schritt (a.) und/oder der Cytokin-mRNA und/oder der adjuvo-viralem mRNA aus Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der jeweiligen Wildtyp-RNA erhöht, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der mRNA

20 aus Schritt (b.) gegenüber der kodierten Aminosäuresequenz der jeweiligen Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.

Diese Modifikation beruht auf der Tatsache, dass für die effiziente Translation einer mRNA die Sequenzabfolge des zu translatierenden Bereichs der mRNA wesentlich

25 ist. Bedeutungsvoll ist hier die Zusammensetzung und die Abfolge der verschiedenen Nukleotide. Insbesondere sind Sequenzen mit erhöhtem G (Guanosin)/C (Cytosin)-Gehalt stabiler als Sequenzen mit einem erhöhten A (Adenosin)/U (Uracil)-Gehalt. Daher werden erfindungsgemäß unter Beibehaltung der translatierten Aminosäureabfolge die Codons gegenüber der Wildtyp-mRNA

30 derart variiert, dass sie vermehrt G/C-Nukleotide beinhalten. Aufgrund der Tatsache,

dass mehrere Codons für ein und dieselbe Aminosäure kodieren (sog. „Degeneration des genetischen Codes“), können die für die Stabilität günstigsten Codons ermittelt werden (sog. „alternative Codonverwendung“ oder englisch: „codon usage“).

5

In Abhängigkeit von der durch die modifizierte mRNA (aus Schritt (a.) oder (b.)) zu kodierenden Aminosäure sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Modifikation der erfindungsgemäßen mRNA-Sequenz oder der Cytokin-mRNA-Sequenz oder der adjuvo-viralen mRNA-Sequenz gegenüber der Wildtyp-Sequenz möglich. Im Fall

10 von Aminosäuren, die durch Codons kodiert werden, die ausschließlich G- oder C-Nukleotide enthalten, ist keine Modifikation des Codons erforderlich. So erfordern die Codons für Pro (CCC oder CCG), Arg (CGC oder CGG), A1a (GCC oder GCG) und Gly (GGC oder GGG) keine Veränderung, da kein A oder U vorhanden ist.

15 Dem entgegen können Codons, welche A- und/oder U-Nukleotide enthalten durch Substitution anderer Codons, welche die gleichen Aminosäuren kodieren, jedoch kein A und/oder U enthalten, verändert werden. Beispiele hierfür sind:

- die Codons für Pro können von CCU oder CCA zu CCC oder CCG verändert
- 20 werden;
- die Codons für Arg können von CGU oder CGA oder AGA oder AGG zu CGC oder CGG verändert werden;
- die Codons für A1a können von GCU oder GCA zu GCC oder GCG verändert werden;
- 25 - die Codons für Gly können von GGU oder GGA zu GGC oder GGG verändert werden.

In anderen Fällen können A- bzw. U-Nukleotide zwar nicht aus den Codons eliminiert werden, jedoch ist es möglich, den A- und U-Gehalt zu verringern, indem

Codons verwendet werden, die einen geringeren Anteil A- und/oder U-Nukleotide enthalten. Beispiele hierfür sind:

- die Codons für Phe können von UUU zu UUC verändert werden;
- 5 - die Codons für Leu können von UUA, UUG, CUU oder CUA zu CUC oder CUG verändert werden;
- die Codons für Ser können von UCU oder UCA oder AGU zu UCC, UCG oder AGC verändert werden;
- das Codon für Tyr kann von UAU zu UAC verändert werden;
- 10 - das Codon für Cys kann von UGU zu UGC verändert werden;
- das Codon His kann von CAU zu CAC verändert werden;
- das Codon für Gln kann von CAA zu CAG verändert werden;
- die Codons für He können von AUU oder AUA zu AUC verändert werden;
- die Codons für Thr können von ACU oder ACA zu ACC oder ACG verändert
- 15 werden;
- das Codon für Asn kann von AAU zu AAC verändert werden;
- das Codon für Lys kann von AAA zu AAG verändert werden;
- die Codons für Val können von GUU oder GUA zu GUC oder GUG verändert werden;
- 20 - das Codon für Asp kann von GAU zu GAC verändert werden;
- das Codon für Glu kann von GAA zu GAG verändert werden,
- das Stop-Codon UAA kann zu UAG oder UGA verändert werden.

Im Falle der Codons für Met (AUG) und Trp (UGG) besteht hingegen keine

25 Möglichkeit der Sequenzmodifikation.

Die vorstehend aufgeführten Substitutionen können sowohl einzeln aber auch in allen möglichen Kombinationen zur Erhöhung des G/C-Gehalts der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der Cytokin-mRNA oder der adjuvo-viralen mRNA

30 gegenüber der jeweiligen Wildtyp-mRNA (der ursprünglichen Sequenz) verwendet

werden. So können beispielsweise alle in der Wildtyp-Sequenz auftretenden Codons für Thr zu ACC (oder ACG) verändert werden. Bevorzugt werden jedoch beispielsweise Kombinationen der vorstehenden Substitutionsmöglichkeiten verwendet:

- 5 - Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz (Wildtyp-mRNA) für Thr kodierenden Codons zu ACC (oder ACG) und Substitution aller ursprünglich für Ser kodierenden Codons zu UCC (oder UCG oder AGC);
- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für He kodierenden Codons zu AUC und Substitution aller ursprünglich für Lys kodierenden Codons zu AAG und
- 10 - Substitution aller ursprünglich für Tyr kodierenden Codons zu UAC;
- Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val kodierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Glu kodierenden Codons zu GAG und Substitution aller ursprünglich für Ala kodierenden Codons zu GCC (oder GCG) und Substitution aller ursprünglich für Arg kodierenden Codons zu CGC (oder CGG);
- 15 - Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val kodierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Glu kodierenden Codons zu GAG und Substitution aller ursprünglich für Ala kodierenden Codons zu GCC (oder GCG) und Substitution aller ursprünglich für Gly kodierenden Codons zu GGC (oder GGG) und Substitution aller ursprünglich für Asn kodierenden Codons zu AAC;
- 20 - Substitution aller in der ursprünglichen Sequenz für Val kodierenden Codons zu GUC (oder GUG) und Substitution aller ursprünglich für Phe kodierenden Codons zu UUC und Substitution aller ursprünglich für Cys kodierenden Codons zu UGC und Substitution aller ursprünglich für Leu kodierenden Codons zu CUG (oder CUC) und Substitution aller ursprünglich für Gln kodierenden Codons zu CAG und Substitution
- 25 aller ursprünglich für Pro kodierenden Codons zu CCC (oder CCG); usw.

Vorzugsweise wird der G/C-Gehalt des für das Antigen kodierenden Bereichs der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der Cytokin-mRNA oder der adjuvo-

30 Punkte, besonders bevorzugt um mindestens 20%-Punkte gegenüber dem G/C-Gehalt des kodierten Bereichs der für das Antigen kodierenden Wildtyp-mRNA erhöht.

Besonders bevorzugt ist es in diesem Zusammenhang, den G/C-Gehalt der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der Cytokin-mRNA oder der adjuvo-viralen mRNA, insbesondere in dem für das Antigen kodierenden Bereich, im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz maximal zu erhöhen.

Eine weitere bevorzugte Modifikation der mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens basiert auf der Erkenntnis, dass die Translationseffizienz ebenfalls durch eine unterschiedliche Häufigkeit im Auftreten von tRNAs in Zellen bestimmt wird. Sind daher in einer RNA-Sequenz vermehrt sogenannte "seltene" Codons vorhanden, so wird die entsprechende mRNA deutlich schlechter translatiert als in dem Fall, dass für relativ "häufige" tRNAs kodierende Codons vorhanden sind.

Somit wird in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der Cytokin-mRNA oder der Cytokin-mRNA oder der adjuvo-viralen mRNA des erfindungsgemäßen Verfahrens, der für das Antigen kodierende Bereich gegenüber dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-mRNA derart verändert, dass mindestens ein Codon der Wildtyp-Sequenz, das für eine in der Zelle relativ seltene tRNA kodiert, gegen ein Codon ausgetauscht, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA kodiert, welche die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA. Durch diese Modifikation werden die RNA-Sequenzen derart modifiziert, dass Codons eingefügt werden, für die häufig vorkommende tRNAs zur Verfügung stehen. Anders ausgedrückt, können durch diese Modifikation erfindungsgemäß alle Codons der Wildtyp-Sequenz, die für eine in der Zelle relativ seltene tRNA kodieren, jeweils gegen ein Codon ausgetauscht werden, das für eine in der Zelle relativ häufige tRNA kodiert, welche jeweils die gleiche Aminosäure trägt wie die relativ seltene tRNA.

Welche tRNAs relativ häufig in der Zelle auftreten und welche demgegenüber relativ selten auftreten, ist einem Fachmann bekannt; vgl. bspw. Akashi, Curr. Opin.

Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Insbesondere bevorzugt sind die Codons, welche für die jeweilige Aminosäure die am häufigsten auftretende tRNA verwenden, also bspw. das Gly-Codon, das die in der (humanen) Zelle am häufigsten auftretende tRNA verwendet.

5

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, den in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der Cytokin-mRNA oder der adjuvo-viralen mRNA erhöhen, insbesondere maximalen, sequenziellen G/C-Anteil mit den "häufigen" Codons zu verknüpfen, ohne die Aminosäuresequenz des durch den kodierenden Bereich der mRNA kodierten Antigens zu verändern. Diese bevorzugte Ausführungsform stellt eine besonders effizient translatierte und stabilisierte erfindungsgemäße mRNA bspw. für das erfindungsgemäße Verfahren bereit.

10

Die Ermittlung einer wie vorstehend beschrieben modifizierten erfindungsgemäßen mRNA (Erhöhung des G/C-Gehalts; Austausch von tRNAs) kann anhand des in der WO 02/098443 - deren Offenbarungsgehalt vollinhaltlich in die vorliegende Erfindung einbezogen wird - erläuterten Computerprogramms ermittelt werden. Mit diesem Computerprogramm kann anhand des genetischen Codes bzw. dessen degenerativer Natur die Nucleotid-Sequenz einer beliebigen mRNA derart modifiziert werden, dass sich ein maximaler G/C-Gehalt in Verbindung mit der Verwendung von Codons, die für möglichst häufig in der Zelle vorkommende tRNAs kodieren, ergibt, wobei die durch die modifizierte mRNA kodierte Aminosäure-Sequenz gegenüber der nicht-modifizierten Sequenz vorzugsweise nicht verändert ist. Alternativ kann auch nur der G/C-Gehalt oder nur die Codonverwendung gegenüber der ursprünglichen Sequenz modifiziert werden. Der Quellcode in Visual Basic 6.0 (eingesetzte Entwicklungsumgebung: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 mit Servicepack 3) ist ebenfalls in der WO 02/098443 angegeben.

20

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der jeweiligen Wildtyp-mRNA erhöht. Diese Modifikation (ein erhöhter A/U-Gehalt um
5 die Ribosomen-Bindungsstelle) erhöht die Effizienz der Ribosomen-Bindung an die erfindungsgemäße mRNA. Eine wirksame Bindung der Ribosomen an die Ribosomen-Bindungsstelle (Kozak-Sequenz: GCCGCCACCAUGG, das AUG bildet das Startcodon) bewirkt wiederum eine effiziente Translation der
10 erfindungsgemäßen mRNA oder der anderen vorgenannten mRNAs mit Adjuvanseigenschaften.

Eine ebenfalls bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei der kodierende Bereich und/oder der 5'-
15 und/oder 3'-nicht-translatierte Bereich der mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) (d.h. Cytokin-mRNA oder adjuvo-virale mRNA) gegenüber der jeweiligen Wildtyp-mRNA derart verändert ist, dass er keine destabilisierenden Sequenzelemente enthält, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten mRNA gegenüber der jeweiligen Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.
20 Es ist bekannt, dass beispielsweise in den Sequenzen eukaryotischer mRNAs destabilisierende Sequenzelemente (DSE) auftreten, an welche Signalproteine binden und den enzymatischen Abbau der mRNA *in vivo* regulieren. Daher können zur weiteren Stabilisierung der modifizierten mRNA gegebenenfalls im für das Antigen kodierenden Bereich ein oder mehrere derartige Veränderungen gegenüber
25 dem entsprechenden Bereich der Wildtyp-mRNA vorgenommen werden, so dass dort keine bzw. im wesentlichen keine destabilisierenden Sequenzelemente enthalten sind. Durch derartige Veränderungen können erfindungsgemäß ebenfalls in den nicht-translatierten Bereichen (3'- und/oder 5'-UTR) vorhandene DSE aus der erfindungsgemäßen mRNA eliminiert werden.

Derartige destabilisierende Sequenzen sind bspw. AU-reiche Sequenzen ("AURES"), die in 3'-UTR-Abschnitten zahlreicher instabiler mRNA vorkommen (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sei. USA 1986, 83: 1670 bis 1674). Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren enthaltenen erfindungsgemäßen oder adjuvanten mRNA-Moleküle sind daher vorzugsweise derart gegenüber der Wildtyp-mRNA verändert, dass sie keine derartigen destabilisierenden Sequenzen aufweisen. Dies gilt auch für solche Sequenzmotive, die von möglichen Endonukleasen erkannt werden, bspw. die Sequenz GAACAAG, die im 3' UTR-Segment des für den Transferin-Rezeptor kodierenden Gens enthalten ist (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969 bis 1980). Auch diese Sequenzmotive werden bevorzugt in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder der adjuvanten mRNA (Cytokin-mRNA oder adjuvo-virale mRNA) des erfindungsgemäßen Verfahrens entfernt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) (bspw. die Cytokin-mRNA) des erfindungsgemäßen Verfahrens eine 5'-Cap-Struktur auf. Beispiele von Cap-Strukturen, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A und G(5')ppp(5')G. Derartige Modifikationen können auch bei der adjuvanten RNA aus Schritt (b.) auftreten.

20

Ferner ist es bevorzugt, dass die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer modifizierten Form einen Poly(A)-Schwanz, vorzugsweise von mindestens 25 Nukleotiden, stärker bevorzugt von mindestens 50 Nukleotiden, noch stärker bevorzugt von mindestens 70 Nukleotiden, ebenfalls stärker bevorzugt von mindestens 100 Nukleotiden, am stärksten bevorzugt von mindestens 200 Nukleotiden aufweist.

25

Ebenfalls bevorzugt weist die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer modifizierten Form mindestens eine IRES und/oder mindestens eine 5'- und/oder 3'-Stabilisierungssequenz auf.

30

Erfindungsgemäß können demnach in die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) eine oder mehrere sog. IRES (engl. „internal ribosomal entry side“) eingefügt werden. Eine IRES kann so als alleinige Ribosomen-Bindungsstelle fungieren, sie kann jedoch auch zur Bereitstellung einer mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) dienen, die mehrere Antigene kodiert, die unabhängig voneinander durch die Ribosomen translatiert werden sollen ("multicistronische mRNA"). Beispiele erfindungsgemäß verwendbarer IRES-Sequenzen sind diejenigen aus Picornaviren (z.B. FMDV), Pestviren (CFFV), Polioviren (PV), Enzephalo-Myocarditis-Viren (ECMV), Maul-und-Klauenseuche-Viren (FMDV), Hepatitis-C-Viren (HCV), 10 Klassisches-Schweinefieber-Viren (CSFV), Murines-Leukoma-Virus (MLV), Simean-Immundefizienz-Viren (SIV) oder Cricket-Paralysis-Viren (CrPV).

Weiterhin bevorzugt weist die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens eine 5'- und/oder 3'- 15 Stabilisierungssequenz auf. Diese Stabilisierungssequenzen in den 5' und/oder 3'- nicht-translatierten Bereichen bewirken eine Erhöhung der Halbwertszeit der erfindungsgemäßen mRNA im Cytosol. Diese Stabilisierungssequenzen können eine 100%ige Sequenzhomologie zu natürlich vorkommenden Sequenzen, die in Viren, Bakterien und Eukaryoten auftreten, aufweisen, können aber auch teilweise oder 20 vollständig synthetischer Natur sein. Als Beispiel für stabilisierende Sequenzen, die in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, können die nicht-translatierten Sequenzen (UTR) des -Globins, bspw. von *Homo sapiens* oder *Xenopus laevis*, genannt werden. Ein anderes Beispiel einer Stabilisierungssequenz weist die allgemeine Formel $(C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC$ auf, die im 3'UTR der sehr 25 stabilen mRNA enthalten ist, die für -Globin, -(I)-Collagen, 15-Lipoxygenase oder für Tyrosin-Hydroxylase kodiert (vgl. Holcik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 bis 2414). Selbstverständlich können derartige Stabilisierungssequenzen einzeln oder in Kombination miteinander als auch in Kombination mit anderen, einem Fachmann bekannten Stabilisierungssequenzen verwendet werden. 30 Bevorzugt liegt die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) des

erfindungsgemäßen Verfahrens daher als Globin-UTR (untranslated regions)-stabilisierte mRNA, insbesondere als β -Globin-UTR-stabilisierte mRNA, vor. Es konnte erfindungsgemäß festgestellt werden, dass die Injektion von nackter β -Globin-UTR (untranslated regions)-stabilisierter erfindungsgemäßer, ggf. in
5 Kombination mit ebenfalls derart oder anders modifizierter adjuvanter mRNA, in die Ohrmuschel eines Säugetiers (z.B. von Mäusen) eine spezifische Immunantwort gegen das Antigen, das durch die erfindungsgemäße mRNA kodiert wird, induziert (17). Mit anderen Worten, haben die Erfinder den Verlauf der injizierten β -Globin-UTR-stabilisierten mRNA und den Typ der Immunantwort, den sie auslöst, verfolgt
10 bzw. untersucht und so eine Translation *in vivo* nachgewiesen (siehe Figur 1). Diese Vakzinierungsstrategie wurde weiter untersucht und es wurde eine pharmazeutische mRNA entwickelt, die in humanen klinischen Versuchen verwendet werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die
15 modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) bzw. die adjuvante RNA aus Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mindestens ein Analoges natürlich vorkommender Nukleotide auf. Dieses/diese Analoges/Analoge dient/dienen der weiteren Stabilisierung der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA, wobei dies auf der Tatsache beruht, dass die in den Zellen vorkommenden RNA-abbauenden
20 Enzyme als Substrat vorzugsweise natürlich vorkommende Nukleotide erkennen. Durch Einfügen von Nukleotid-Analoga in die RNA kann daher der RNA-Abbau erschwert werden, wobei die Auswirkung auf die Translationseffizienz bei Einfügen dieser Analoga, insbesondere in den kodierenden Bereich der mRNA, einen positiven oder negativen Effekt auf die Translationseffizienz haben kann. In einer
25 keineswegs abschließenden Aufzählung können als Beispiele erfindungsgemäß verwendbarer Nukleotidanaloga Phosphoramidate, Phosphorthioate, Peptidnukleotide, Methylphosphonate, 7-Deazaguanosin, 5-Methylcytosin und Inosin genannt werden. Die Herstellung derartiger Analoga sind einem Fachmann bspw. aus den US-Patenten 4,373,071, US 4,401,796, US 4,415,732, US
30 4,458,066, US 4,500,707, US 4,668,777, US 4,973,679, US 5,047,524, US

5,132,418, US 5,153,319, US 5,262,530 und 5,700,642 bekannt. Erfindungsgemäß können derartige Analoga in nicht-translatierten und translatierten Bereichen der modifizierten mRNA vorkommen.

- 5 Einem Fachmann sind verschiedene Verfahren geläufig, die beschriebenen Modifikationen vorzunehmen. Einige dieser Verfahren wurden bereits in dem obigen Abschnitt zu den Varianten der Erfindung beschrieben. Beispielsweise kann zur Substitution von Codons in der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA bzw. einer mRNA (Cytokin-mRNA oder adjuvo-viraler mRNA) oder adjuvanten RNA aus
- 10 Schritt (b.) oder im Falle kürzerer kodierender Bereiche die gesamte erfindungsgemäße mRNA chemisch unter Verwendung von Standardtechniken synthetisiert werden.

- Bevorzugt werden allerdings Substitutionen, Additionen oder Eliminierungen von
- 15 Basen unter Verwendung einer DNA-Matrize zur Herstellung der modifizierten erfindungsgemäßen mRNA oder einer mRNA aus Schritt (b.) mit Hilfe von Techniken der gängigen zielgerichteten Mutagenese eingeführt (siehe z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl., Cold Spring Harbor, NY, 2001). Bei einem solchen Verfahren wird
- 20 zur Herstellung der erfindungsgemäßen mRNA oder einer mRNA aus Schritt (b.) ein entsprechendes DNA-Molekül *in vitro* transkribiert. Diese DNA-Matrize besitzt einen geeigneten Promotor, bspw. einen 17 -oder SP6-Promotor, für die *in vitro* Transkription, dem die gewünschte Nukleotidsequenz für die herzustellende (erfindungsgemäße) mRNA und ein Terminationssignal für die *in vitro* Transkription
- 25 folgen. Erfindungsgemäß wird das DNA-Molekül, das die Matrize des herzustellenden RNA-Konstrukts bildet, durch fermentative Vermehrung und anschließende Isolierung als Teil eines in Bakterien replizierbaren Plasmids hergestellt. Als für die vorliegende Erfindung geeignete Plasmide können bspw. die Plasmide pT7Ts (GenBank-Zugriffsnummer U26404; Lai et al., Development 1995,
- 30 121 : 2349 bis 2360), pGEM®-Reihe, bspw. pGEM®-1 (GenBank-Zugriffsnummer

X65300; von Promega) und pSP64 (GenBank-Zugriffsnummer X65327) genannt werden; vgl. auch Mezei und Starts, Purification of PCR Products, in: Griffin und Griffin (Hrsg.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

5

Es kann so unter Verwendung kurzer synthetischer DNA-Oligonukleotide, die an den entstehenden Schnittstellen kurze einzelsträngige Übergänge aufweisen, oder durch chemische Synthese hergestellte Gene die gewünschte Nukleotidsequenz nach einem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Methoden in ein
10 geeignetes Plasmid kloniert werden (vgl. Maniatis et al., supra). Das DNA-Molekül wird dann aus dem Plasmid, in welchem es in einfacher oder mehrfacher Kopie vorliegen kann, durch Verdauung mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten.

Neben den vorgenannten Modifikationen auf der Ebene der Nukleotidsequenz
15 können weitere Modifikationen in die mRNA aus Schritt a. und/oder b. eingeführt werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die mRNA aus Schritt (a.) und/oder Schritt (b.) bzw. die adjuvante RNA aus Schritt (b.) des
20 erfindungsgemäßen Verfahrens mit mindestens einem kationischen oder polykationischen Agens komplexiert oder kondensiert ist und insoweit modifiziert. Bevorzugt handelt es sich bei einem solchen kationischen oder polykationischen Agens um ein Agens, das aus der Gruppe bestehend aus Protamin, Poly-L-Lysin, Poly-L-Arginin und Histonen ausgewählt ist.

25

Durch diese Modifikation auf der Basis der Komplexierung der mRNA aus Schritt (a.) (erfindungsgemäße mRNA) und/oder Schritt (b.) bzw. der adjuvanten RNA aus Schritt (b.) kann der wirksame Transfer der modifizierten (m)RNA in die zu behandelnden Zellen bzw. das zu behandelnde Gewebe bzw. den zu
30 behandelnden Organismus dadurch verbessert werden, dass die vorgenannte

- (m)RNA mit einem kationischen Peptid oder Protein assoziiert oder daran gebunden ist. Insbesondere ist dabei die Verwendung von Protamin als polykationisches, Nukleinsäure-bindendes Protein besonders wirksam. Die Verwendung anderer kationischer Peptide oder Proteine, wie Poly-L-Lysin oder Histonen, ist selbstverständlich ebenfalls möglich. Diese Vorgehensweise zur Stabilisierung der vorgenannten (m)RNA-Moleküle in einem erfindungsgemäßen Verfahren wird beispielsweise in EP-A-1 083232 beschrieben, deren diesbezüglicher Offenbarungsgehalt in die vorliegende Erfindung vollumfänglich eingeschlossen ist.
- 10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die modifizierte erfindungsgemäße mRNA oder die adjuvante mRNA bzw. adjuvante RNA aus dem Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Polyethylenimin (PEI) stabilisiert und insoweit modifiziert.
- 15 Die erfindungsgemäße mRNA, die Cytokin-mRNA, die adjuvo-virale mRNA und/oder die adjuvante RNA (jeweils modifiziert oder nicht) kann einzel- oder doppelsträngig vorliegen und als solche oder einem Gemisch in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Im Falle einer Doppelsträngigkeit kann auch zumindest ein üblicherweise offenes Ende des Doppelstrangs, vorzugsweise beide, miteinander kovalent verbunden sein, bspw. über eine „hairpin“-Struktur.
- 20 Sämtliche der, unter Bezugnahme auf die erfindungsgemäße mRNA aus Schritt (a.), voranstehend beschriebenen Modifikationen (z.B. Einführung von Nukleotidanaloga, 5'-Cap-Struktur usw.), finden im Sinne der Erfindung ebenfalls auf die adjuvante RNA bzw. auf die Cytokin-mRNA oder adjuvo-virale mRNA aus Schritt (b.) des erfindungsgemäßen Verfahrens Anwendung.
- Die vorstehend beschriebenen, sämtlichen Modifikationen der erfindungsgemäßen mRNA bzw. der Cytokin-mRNA, der adjuvo-viralen mRNA bzw. der adjuvanten
- 30

RNA des erfindungsgemäßen Verfahrens können im Sinne der Erfindung einzeln oder in Kombinationen miteinander auftreten.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Erzeugnis, enthaltend mindestens
- 5 eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und mindestens eine Komponente mindestens einer der nachfolgenden Kategorien, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Cytokin, einer Cytokin-mRNA, einer adjuvo-viralen mRNA, einer CpG DNA und einer adjuvanten RNA, als
- 10 Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung bei der Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen (z.B. Lymphome, Pankreastumor, Melanome sowie andere Hautkrebsarten, solide Tumore der Leber, der Lunge, des Kopfes, des Darms, des Magens, Sarkome) , Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, viralen und/oder
- 15 bakteriellen Infektionen, insbesondere HIV, Influenza, Röteln, Masern, Tollwut, Herpes, Dengue-Fieber, Gelbfieber, Hepatitis, Pneumonien, Legionärskrankheit, Streptokokken-, Enterokokken-, Staphylokokken-Infektionen oder Infektionen mit protozoologischen Erregern, bspw. Trypanosomen.
- 20 Patienten mit den vorgenannten Indikationen können auch mit einem erfindungsgemäßen Verfahren behandelt werden.

- Die Bestandteile des erfindungsgemäßen Erzeugnisses: mindestens eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines
- 25 Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich (1. Bestandteil) und mindestens ein Cytokin und/oder mindestens eine Cytokin-mRNA und/oder mindestens eine adjuvo-virale mRNA und/oder mindestens eine CpG DNA und/oder mindestens eine adjuvante RNA (2. Bestandteil), stehen durch ihre zielgerichtete Verwendung in funktioneller Einheit. Die Bestandteile des
- 30 Erzeugnisses können die oben beschriebene, erfindungsgemäße, vorteilhafte

Wirkung nicht unabhängig voneinander entfalten, so dass trotz der räumlichen Trennung der Bestandteile 1 und 2 (zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Verabreichung) ihre Anwendung als neues, nicht im Stand der Technik beschriebenes Kombinationserzeugnis vorliegt. Da der Bestandteil 2 mehrere
5 Komponenten enthalten kann, bspw. Cytokin-mRNA und CpG DNA oder ein Cytokin und CpG DNA oder auch 2 verschiedene Cytokin-mRNAs, kann der Bestandteil 2 als Gemisch (ggf. verschiedener) Komponenten ggf. verschiedener der vorgenannten Kategorien oder aber die (ggf. verschiedenen) Komponenten ggf. verschiedener der vorgenannten Kategorien des Bestandteils 2 können auch separat
10 voneinander vorliegen.

Ein erfindungsgemäßes Erzeugnis kann alle Bestandteile, Substanzen und Ausführungsformen umfassen, wie sie in einem Verfahren bzw. Therapieverfahren bzw. Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen bzw.
15 Kombinationstherapieverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Kit, das mindestens eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines
20 Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und mindestens eine Komponente aus mindestens einer der nachfolgend Kategorien, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Cytokin, einer Cytokin-mRNA, einer adjuvo-viralen mRNA, einer CpG DNA und einer adjuvanten RNA, enthält, wobei die mindestens eine erfindungsgemäße mRNA, enthaltend einen für mindestens ein
25 Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und das mindestens eine Cytokin oder mindestens eine Cytokin-mRNA oder mindestens eine adjuvo-virale mRNA oder mindestens eine CpG DNA oder mindestens eine adjuvante RNA voneinander getrennt sind, also das Kit aus mindestens zwei Teilen besteht. Mehr als zwei Teile wird das Kit dann enthalten,
30 wenn i.S. dieser Erfindung zwei oder mehr als adjuvante Komponenten, wie sie

bspw. in Verfahrensschritt (b.) verabreicht werden können, voneinander getrennt im Kit enthalten sind.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des Kits zur
5 Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebserkrankungen, Tumorerkrankungen, insbesondere von den vorgenannten spezifischen Tumorspecies, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, und/oder viralen und/oder bakteriellen Infektionen, wie beispielsweise Hepatitis B, HIV oder MDR (multi-drug resistance)-Infektionen, Influenza, Herpes, Röteln, Masern, Tollwut, Streptokokken-,
10 Pneumokokken-, Enterokokken-, Staphylokokken- oder Escherichia-Infektionen oder weitere in dieser Anmeldung genannte Infektionserkrankungen.

Die in der nachfolgenden Beschreibung der Figuren sowie in den nachfolgenden Beispielen genannte mRNA betrifft die erfindungsgemäße mRNA.

15

Figuren

Figur 1 zeigt die *in vivo* Translation von injizierter erfindungsgemäßer mRNA. Mäusen wurden in die Ohrmuschel Injektionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES) („Puffer“), β -Galactosidase kodierende β -Globin-UTR-stabilisierte mRNA, verdünnt in Injektionspuffer, („Lac Z mRNA“) oder β -Galactosidase kodierende DNA in PBS („lacZ DNA“) injiziert. 16 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse getötet, die Ohren wurden rasiert, entfernt und in Einbettungsmedium eingefroren. Dann
20 wurden Gefrierabschnitte angefertigt, fixiert und über Nacht mit X-Gal enthaltender Lösung angefärbt. Zellen, die β -Galactosidase exprimierten, erschienen blau. Die Anzahl der in jeden Abschnitt detektierten blauen Zellen wird in den Diagrammen (linke Hälfte der Figur 1) dargestellt. Auf der X-Achse ist die Länge des analysierten
25 Ohrabschnitts aufgetragen (0 ist willkürlich dem ersten Abschnitt,
30

zugeordnet, der blaue Zellen zeigt; bei den mit Puffer injizierten Mäusen, wurde der Bereich, der 2 mm um die Injektionsstelle lag, analysiert und die 0 willkürlich bestimmt): Jeder Abschnitt beträgt 50 μ m und somit decken einige aufeinanderfolgende Abschnitte eine Gesamtdistanz von einigen Millimetern ab. In jedem der Diagramme (Puffer-injizierte Mäuse, mRNA-injizierte Mäuse, DNA-injizierte Mäuse) sind die beiden Abschnitte, die durch einen Stern und eine graue Säule gekennzeichnet sind, die Abschnitte, die in den begleitenden Mikroskopie-Abbildungen (rechte Hälfte der Figur 1) dargestellt sind. Hier zeigen offene Pfeile eine endogene Expression der β -Galactosidase-Aktivität hauptsächlich in den Ohrfollikeln an. Diese endogene Aktivität ist durch eine sehr schwache und diffuse Blaufärbung erkennbar. Schwarz ausgefüllte Pfeile zeigen blaue Zellen an, die aus der Aufnahme und Translation einer β -Galactosidase kodierenden exogenen Nukleinsäure resultieren. Solche Zellen sind an der Injektionsstelle in der Dermis lokalisiert und zeigen eine starke Blaufärbung. Einzelne Abschnitte wurden fotografiert. Die Abschnitte mit den meisten blauen Zellen werden dargestellt (sie entsprechen den Abschnitten, die in den Diagrammen mit einem Stern markiert sind). Die Anzahl der blauen Zellen in jedem der aufeinanderfolgenden Abschnitte wird auf den Y-Achsen in den Diagrammen (linke Hälfte der Figur 1) dargestellt.

Figur 2 zeigt die Auslösung einer Antigen-spezifischen Immunantwort des Typs Th2, durch die Injektion von mRNA. Mäuse wurden vakziniert und verstärkt („boosted“) mit mRNA oder DNA, die für β -Galactosidase kodiert, oder ihnen wurde Injektionspuffer injiziert. Zwei Wochen später erhielten die Mäuse eine Auffrischungsinjektion (Boost-Injektion). Wiederum zwei Wochen später wurde die Menge an β -Galactosidase-spezifischen Antikörpern, die in dem Serum

vorhanden waren, durch ELISA unter Verwendung von Isotyp-spezifischen Reagenzien bestimmt. Die linke Hälfte der Figur 2 zeigt die IgG1-Produktion, die rechte Hälfte der Figur 2 zeigt die IgG2a-Produktion. () zeigt die Kurve für DNA-injizierte Mäuse, () zeigt die Kurve für RNA-injizierte Mäuse und (♦) zeigt die Kurve für Mäuse, die mit Injektionspuffer injiziert wurden.

Figur 3 zeigt die Polarisation einer Th2-Immunantwort in eine Th1-Immunantwort, verursacht durch die Injektion von GM-CSF. Alle dargestellten Ergebnisse betreffen Mäuse der gleichen Gruppe in einem Experiment. Die Gesamtanzahl der Mäuse, die in vier unabhängigen Experimenten eine Immunantwort zeigten, wird in Tabelle 1 (Figur 4) dargestellt.

Figur 3a: Den Mäusen wurde entweder β -Galactosidase, emulgiert in Freund's Adjuvanz, oder mRNA, die für β -Galactosidase kodiert, oder Injektionspuffer (als Negativkontrolle) injiziert. GM-CSF (Gesamtmenge 2 μ g rekombinantes Protein: ca. 10^4 U (Units)) wurde einmal injiziert, entweder 24 Stunden oder 2 Stunden vor der Injektion der mRNA oder 24 Stunden nach der Injektion der mRNA (entspricht den Gruppen GM-CSF T-1, GM-CSF T-O und GM-CSF T+1). Die Menge an β -Galactosidase-spezifischen IgG1- oder IgG2a-Antikörpern, die im Blut der injizierten Mäuse enthalten waren, wurden durch ELISA bestimmt (1:10 Serumverdünnung). Der Hintergrund, der hauptsächlich durch das Serum von Puffer-injizierten Mäusen bei gleicher Verdünnung erhalten wurde, wurde abgezogen. Die linke Hälfte der Figur 3a zeigt β -Gal-spezifische IgG1-Antikörper (), die rechte Hälfte der Figur 3a zeigt β -Gal-spezifische IgG2a-Antikörper (□, grau).

Figur 3b: Die *in vitro* Reaktivierung von T-Zellen durch β -Galactosidase wurde anhand einer Cytokin-Detektion am Tag 4 der Kultivierung überprüft. Der Anteil an IFN γ () und IL-4 (Q, grau) in dem Überstand der verwendeten Splenocyten-Kultur wurde mittels ELISA gemessen.

5

Figur 3c: Die cytotoxische Aktivität von Splenocyten, die in der Gegenwart von aufgereinigter β -Galactosidase für sechs Tage kultiviert wurden, wurde in einem Chrom-Freisetzungs-Assay überprüft. Die Zielzellen waren P815 (H2^d)-Zellen, die entweder mit dem synthetischen Peptid TPHPARIGL, das dem dominanten H2-L^d-Epitop von β -Galactosidase entspricht, beladen waren () oder nicht beladen waren ().

10

Figur 4 zeigt Tabelle 1, in der die Gesamtanzahl der injizierten Mäuse dargestellt wird. Die Gesamtanzahl der Mäuse, deren Splenocyten eine detektierbare Cytokin-Freisetzung oder eine β -Galactosidase-spezifische cytotoxische Aktivität *in vitro* in unabhängigen Experimenten zeigten, wird dargestellt. Mäuse, bei denen mindestens 10% mehr TPHPARIGL-beladene Zellen abgetötet wurden, im Vergleich zu den durchschnittlich abgetöteten Zellen der Negativkontrollgruppe (Puffer-injizierte Mäuse), wurden als Mäuse mit einer Immunantwort (respondierende) eingestuft. Splenocytenkulturen, die mindestens 100 pg/ml Cytokin mehr als den Gesamtgehalt an Cytokin in den Splenocytenkulturen, der Negativkontrollmäuse (Puffer-injizierte Mäuse) enthielten, wurden als respondierende Kulturen (respondierende Mäuse) eingestuft. Die fettgedruckten Zahlen zeigen Gruppen an, in denen mehr als die Hälfte der Mäuse eine Immunantwort auf die Vakzine gemäß der untersuchten Parameter (Cytokin oder cytotoxische Aktivität) zeigten.

15

20

25

Figur 5: zeigt die Polarisation einer Th2-Immunantwort in eine Th1-Immunantwort, verursacht durch die Injektion von GM-CSF-RNA zusätzlich zur erfindungsgemäßen mRNA. Alle dargestellten Ergebnisse betreffen Mäuse der gleichen Gruppe in einem Experiment.

5 Den Mäusen wurde dazu mRNA, die für β -Galactosidase kodiert, GM-CSF-RNA oder Injektionspuffer injiziert. GM-CSF-RNA (Gesamtmenge 50 μ g) wurde einmal injiziert, entweder 24 Stunden oder 2 Stunden vor der Injektion der mRNA oder 24 Stunden nach der Injektion der mRNA (entspricht den Gruppen GM-CSF-RNA T-1, GM-CSF-RNA T-O

10 und GM-CSF-RNA T+1). Die Menge an sekretiertem IFN- γ , die im Blut der injizierten Mäuse enthalten waren, wurden durch ELISA bestimmt.

Die nachfolgenden Beispiele sind dazu gedacht, die Erfindung weiter zu illustrieren. Sie sind nicht dazu gedacht, die Gegenstände der Erfindung hierauf zu beschränken.

Beispiele

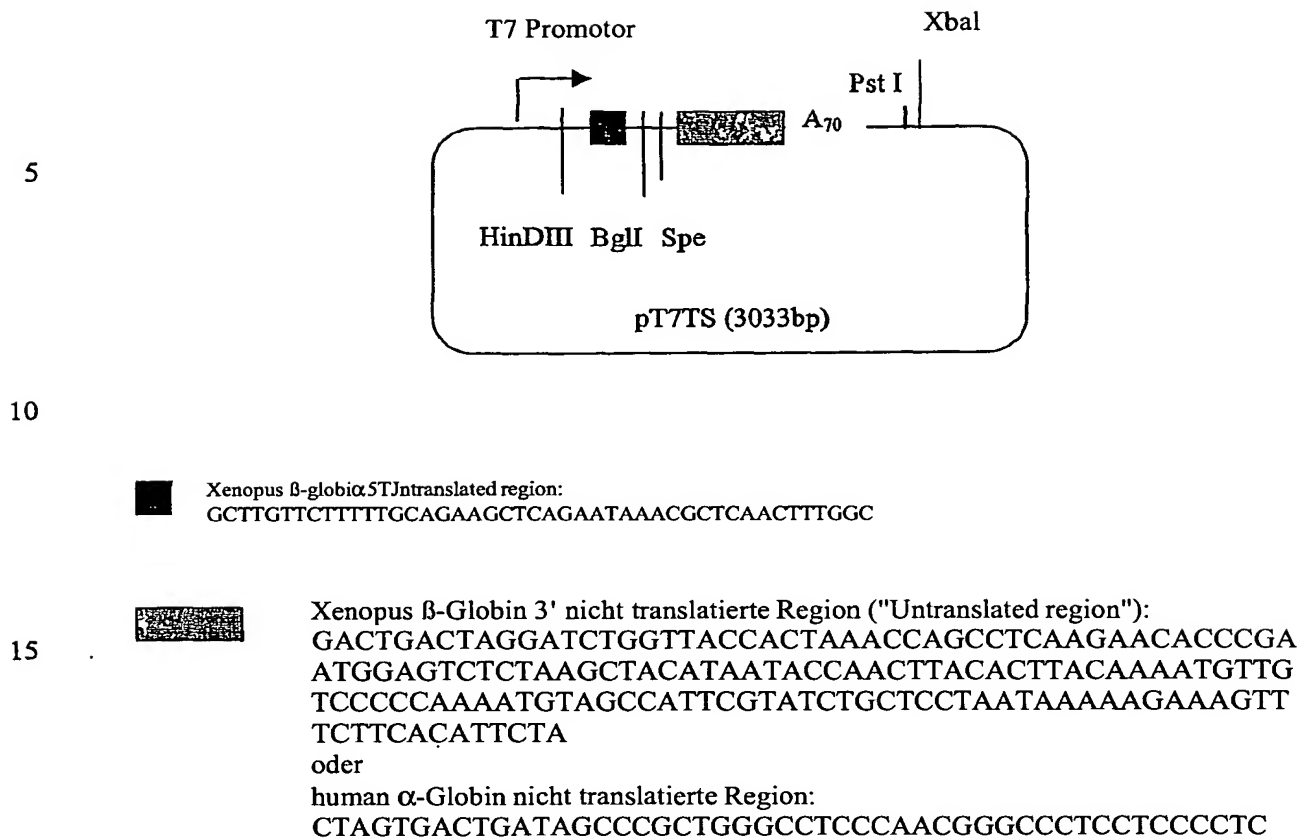
Beispiel 1: Herstellung der mRNA

- 5 Die mRNA wurde durch *in vitro* Transkription geeigneter Template-DNA und anschliessender Extraktion und Aufreinigung der mRNA erhalten. Hierzu können Standardverfahren verwendet, die im Stand der Technik zahlreich beschrieben werden und dem Fachmann geläufig sind. Beispielsweise Maniatis et al. (2001), Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 10 Gleiches gilt auch für die Sequenzierung der mRNA, die sich der (nachfolgend beschriebenen) Aufreinigung der mRNA anschloss. Hier wurde insbesondere das NBLAST-Programm verwendet.

- Die Herstellung der erfindungsgemäßen mRNA erfolgte generell gemäß
- 15 nachfolgender Vorgehensweise:

1. Vektor

Die Gene, für welche die jeweilige mRNA kodiert, wurden in den Plasmidvektor pT7TS eingeführt. pT7TS enthält nicht translatierte Regionen des alpha- oder des beta-Globingens sowie einen polyA-Schwanz von 70 Nukleotiden:



20 Abbildung 1: Graphik des Plasmidvektors pT7TS

Plasmide mit hoher Reinheit wurden mit dem Qiagen Endo-free Maxiprep Kit oder mit dem Machery-Nagel GigaPrep Kit erhalten. Die Sequenz des Vektors wurde über eine Doppelstrang-Sequenzierung vom T7 Promotor bis zur PstI- oder XbaI-Stelle kontrolliert und dokumentiert. Plasmide, deren einklonierte Gensequenz korrekt und ohne Mutationen war, wurden für die *in vitro* Transkription benutzt.

2. Gene

Die Gene, für welche die erfindungsgemäße mRNA kodiert, wurden mittels PCR amplifiziert oder aus den (oben beschriebenen) Plasmiden extrahiert. Beispiele für Genkonstrukte, die eingesetzt wurden, sind

5 GPI 00 (Accession number M77348):

PCR-Fragment SpeI in T7TS HindIII blunt/SpeI

MAGE-A1 (Accession number M77481):

Plasmid-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

10

MAGE-A6 (Accession number: NM_005363):

PCR-Fragment SpeI in T7TS HindIIIblunt/SpeI

Her2/neu (Accession number: M1 1730):

15 PCR-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

Tyrosinase (Accession number: NM_000372):

Plasmid-Fragment EcoRI blunt in T7TS HindIII blunt/SpeI blunt

20 Melan-A (Accession number: NM_00551 1):

Plasmid-Fragment NotI blunt in T7TS HindIII blunt/SpeI blunt

CEA (Accession number: NM_004363):

PCR-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

25

Tert (Accession number: NM_00321 9):

PCR fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

WT1 (Accession number: NM_000378):

30 Plasmid fragment EcoRV/KpnI blunt in T7TS HindIII blunt/SpeI blunt

PR3 (Accession number: NM_002777):

Plasmid fragment EcoRI blunt/XbaI in T7TS HindIII blunt/SpeI

5 PRAME (Accession number: NM_006115):

Plasmid fragment BamHI blunt/XbaI in T7TS HindIII blunt/SpeI

Survivin (Accession number AF077350):

PCR-Fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

10

Mucini (Accession number NM_002456):

Plasmid-Fragment: SacI blunt/BamHI in T7TS HindIII blunt/BglII

Tenascin (Accession number X78565):

15 PCR fragment BglII blunt/SpeI in T7TS HindIII blunt/SpeI

EGFR1 (Accession number AF288738):

PCR fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/Spe I

20 Sox9 (Accession number Z46629):

PCR fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

Sec61 G (Accession number NM_014302):

PCR fragment HindIII/SpeI in T7TS HindIII/SpeI

25

PTRZ1 (Accession number NM_002851):

PCR fragment EcoRV/SpeI in T7TS HindIII blunt/SpeI

3. *in vitro* Transkription

3.1 . Herstellung Protein-freier DNA

500 µg von jedem der vorbeschriebenen Plasmide wurden in einem Volumen von 2,5 ml durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym PstI oder XbaI in einem 15 ml Falcon Röhrchen linearisiert. Dieses geschnittene DNA-Konstrukt wurde in die RNA Produktionseinheit überführt. 2,5 ml einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde zu der linearisierten DNA zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 2 Minuten gevortext und für 5 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert. Die wässrig Phase wurde abgehoben und mit 1,75 ml 2-Propanol in einem 15 ml Falcon Röhrchen vermischt. Dieses Gefäß wurde 30 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 5 ml von 75% Ethanol zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Ethanol wurde entfernt. Das Gefäß wurde nochmals für 2 Minuten zentrifugiert und die Reste des Ethanols wurden mit einer Mikroliter-Pipettenspitze entfernt. Das DNA Pellet wurde dann in 500 µl RNase-freien Wasser aufgelöst (1 µg/µl).

3.2. enzymatische mRNA-Synthese

Materialien:

- 20 - T7 Polymerase: aufgereinigt aus einem Eco/Z-Stamm, der ein Plasmid mit dem Gen für die Polymerase enthält. Diese RNA-Polymerase verwendet als Substrat nur 17 Phagen-Promotor-Sequenzen (Fa. Fermentas),
- NTPs: chemisch synthetisiert und über HPLC aufgereinigt. Reinheit über 96% (Fa. Fermentas),
- 25 - CAP Analogon: chemisch synthetisiert und über HPLC aufgereinigt. Reinheit über 90% (Fa. Trilink),
- RNase Inhibitor: Rnasin, Injectable grade, rekombinant hergestellt (Eco/ri (Fa. Fermentas),

DNase: Vertrieb als Medikament über Apotheken als Pulmozym® (domase alfa) (Fa. Roche).

In ein 15 ml Falcon Röhrchen wurde folgendes Reaktionsgemisch pipettiert:

- 5 100 µg linearisierte proteinfreie DNA,
- 400 µl 5x Puffer (Tris-HCl pH 7.5, MgCl₂, Spermidin, DTT, Inorganische Pyrophosphatase 25 U),
- 20 µl Ribonuclease Inhibitor (rekombinant, 40 U/µl);
- 80 µl rNTP-Mix (ATP, CTP, UTP 100mM) , 29µl GTP (100 mM);
- 10 116 µl Cap Analog (100 mM);
- 50 µl 17 RNA Polymerase (200 U/µl) ;
- 1045 µl RNase-freies Wasser.

- Das Gesamtvolumen betrug 2 ml und wurde für 2 Stunden bei 37 °C im Heizblock
- 15 inkubiert. Danach wurden 300 µl DNase: Pulmozyme™ (1 U/µl) zugegeben und die Mischung wurde für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurde das DNA-Template enzymatisch abgebaut.

5. Aufreinigung der mRNAs

20 5.1 . LiCl-Präzipitation (Lithium-Chlorid/Ethanol-fällung)

Bezogen auf 20-40 µg RNA wurde diese folgendermaßen durchgeführt:

LiCl-Fällung 25 µl LiCl-Lösung f8MI

- 30 µl WFI („water for injection“, Wasser zur Injektion) wurden zu dem Transkriptionsansatz (20 µl) gegeben und vorsichtig gemischt. In das Reaktionsgefäß
- 25 wurden 25 µl LiCl-Lösung zugegeben und die Lösungen mindestens 10 Sekunden gevortext. Der Ansatz wurde bei
- 20 °C für mindestens 1 Stunde inkubiert. Das verschlossene Gefäß wurde anschließend bei 4°C mit 4.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Waschen

Es wurden 5 µl 75%iger Ethanol zu jedem Pellet zugegeben (unter der Sicherheitswerkbank). Die verschlossenen Gefäße wurden 20 Minuten bei 4°C mit 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen (unter der Sicherheitswerkbank) und es wurde nochmals 2 Minuten bei 4°C mit 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt (unter der Sicherheitswerkbank). Danach wurde das Pellet ca. 1 Stunde getrocknet (unter der Sicherheitswerkbank).

10 Resuspension

Zu den gut getrockneten Pellets wurden je 10 µl WFI gegeben (unter der Sicherheitswerkbank). Das jeweilige Pellet wurde sodann in einem Schüttelgerät über Nacht bei 4°C gelöst.

15 5.2. Endreinigung

Die Endreinigung erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Sie kann jedoch ebenfalls mittels Anionenaustauschchromatographie erfolgen (z.B. MEGAclear™ von Fa. Ambion oder Rneasy von Fa. Qiagen). Nach dieser Aufreinigung der mRNA, wurde die RNA gegen Isopropanol und NaCl präzipitiert (1 M NaCl 1:10, Isopropanol 1:1, gevortext, 30 Min. bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen). Die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigte RNA wurde in RNase freiem Wasser gelöst und mindestens 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Konzentration jeder mRNA wurde bei OD₂₆₀ Absorption gemessen. (Die Chlorophorm-Phenol-Extraktion erfolgte nach Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1,2,3 (1989)).

Beispiel 2: Stabilisierung der mRNA

Eine beispielhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen, stabilisierten mRNA betrifft eine β -Globin-UTR-stabilisierte mRNA. Eine derart stabilisierte mRNA wies
5 die folgende Struktur auf: Cap- β -Globin-UTR (80 Basen) - β -Galactosidase-Kodierungssequenz - β -Globin-3'-UTR (ca. 180 Basen)-poly A-Schwanz ($A_{30}C_{30}$). Anstelle der β -Galactosidase-Kodierungssequenz wurden ebenfalls Konstrukte erstellt, die eine für ein bereits oben beschriebenes Antigen aus einem Pathogen oder Tumor kodierende Sequenz aufwiesen.

10

Als weitere beispielhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen, stabilisierten mRNA wurde die Nukleinsäuresequenz des kodierenden Bereichs der mRNA bezüglich ihres G/C-Gehalts optimiert. Zur Ermittlung der Sequenz einer modifizierten, erfindungsgemäßen mRNA wurde das in der WO 02/098443
15 beschriebene Computerprogramm verwendet, das mit Hilfe des genetischen Codes bzw. dessen degenerativer Natur die Nucleotid-Sequenz einer beliebigen mRNA derart modifiziert, dass sich ein maximaler G/C-Gehalt in Verbindung mit der Verwendung von Codons, die für möglichst häufig in der Zelle vorkommende tRNAs kodieren, ergibt, wobei die durch die modifizierte mRNA kodierte
20 Aminosäure-Sequenz gegenüber der nicht-modifizierten Sequenz vorzugsweise identisch ist. Alternativ kann auch nur der G/C-Gehalt oder nur die Codonverwendung gegenüber der ursprünglichen Sequenz modifiziert werden. Der Quellcode in Visual Basic 6.0 (eingesetzte Entwicklungsumgebung: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 mit Servicepack 3) ist ebenfalls in der WO 02/098443, deren
25 Offenbarung Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, angegeben.

Beispiel 3: Zellkultivierung

P815-Zellen wurden mit 10%igem Hitze-inaktivierten fötalen Kälberserum (PAN
30 Systems, Deutschland), 2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin ergänzt und in einem RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Verviers, Belgien)

kultiviert. Die CTL-Kultivierung wurde in RPMI 1640-Medium, ergänzt mit 10%igem FCS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 50 µg/ml Gentamycin, 1x MEM-nicht essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat, ausgeführt. Die CTLs wurden eine Woche lang mit 1 µg/ml β-Galactosidase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) restimuliert. Am Tag 4 wurden die Überstände vorsichtig gesammelt und durch frisches Medium ersetzt, das 10 U/ml rIL-2 (Endkonzentration) enthielt.

In parallelen Versuchsansätzen erfolgte die Restimulierung mit jeweils 1,3 µg/ml Survivin, 1 µg MAGE-3 und 0,8 µg Muc-1. Sämtliche anderen Bedingungen waren in diesen Versuchsansätzen identisch mit den vorbeschriebenen Bedingungen.

Beispiel 4: Immunisierung von Mäusen

6 bis 12 Wochen alte, weibliche BALB/c AnNCrIBR (H-2d)-Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Eine Genehmigung für die genetische (DNA und mRNA) Vakzinierung der Mäuse wurde von dem Komitee für Tierethik in Tübingen erteilt (Nummer IM/200). Die BALB-Mäuse wurden mit 20 mg Pentobarbital intraperitoneal anästhesiert. Den Mäusen wurden dann intradermal in beide Ohrmuscheln 25 µg β-Globin-UTR-stabilisierte mRNA, kodierend für β-Galactosidase, die mit Injektionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES) verdünnt wurde, injiziert. Es wurden nachfolgend 5.10³ Units (1 µg) GM-CSF (Peprotech, Inc, Rocky Hill, New York, USA), verdünnt mit 25 µl PBS, injiziert. Dies entsprach einer Gesamtmenge von 2 µg (ca. 10⁴ Units), die lediglich einmal injiziert wurde. Eine solche Dosierung liegt in dem untersten Bereich der normalerweise bei Mäusen gewählten Dosierungen (26). Zwei Wochen nach der ersten Injektion wurden die Mäuse unter den gleichen Bedingungen (wie bei der ersten Injektion) behandelt.

In parallelen Versuchsansätzen I, II + III, die unter den gleichen, vorstehend beschriebenen, Bedingungen, durchgeführt wurden, wurde Mäusen anstelle von 25

µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, die für β-Galactosidase kodierte, und 1 µg GM-CSF in

Versuchsansatz I: 30 µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, kodierend für Survivin und 1,2 µg IL-2, in

5 Versuchsansatz II: 23 µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, kodierend für MAGE-3 und 2 µg IL-12 und in

Versuchsansatz III: 18 µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, kodierend für Muc-1 und 1 µg IFN-α

injiziert.

10

GM-CSF (Gesamtmenge 2 µg rekombinantes Protein: ca. 10⁴ U (Units)) wurde einmal injiziert, entweder 24 Stunden oder 2 Stunden vor der Injektion der mRNA oder 24 Stunden nach der Injektion der mRNA (entspricht den Gruppen GM-CSF T-1, GM-CSF T-O und GM-CSF T+1). Die Menge an β-Galactosidase-spezifischen
15 IgG1- oder IgG2a-Antikörpern, die im Blut der injizierten Mäuse enthalten waren, wurden durch ELISA bestimmt (1:10 Serumverdünnung). Der Hintergrund, der hauptsächlich durch das Serum von Puffer-injizierten Mäusen bei gleicher Verdünnung erhalten wurde, wurde abgezogen.

20 Beispiel 5: Chromfreisetzungs-Assay

Splenocyten wurden *in vitro* mit aufgereinigter β-Galactosidase (1 mg/ml) stimuliert und die CTL-Aktivität wurde nach 6 Tagen unter Verwenden eines Standard ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assays bestimmt (wie beispielsweise beschrieben von Rammensee et
25 al., 1989, Immunogenetics 30: 296-302). Die Sterberate der Zellen wurde anhand der in das Medium freigesetzten Menge an ⁵¹Cr (A) im Vergleich zu der Menge spontaner ⁵¹Cr-Freisetzung der Zielzellen (B) und dem Gesamtgehalt an ⁵¹Cr von 1% Triton-X-100-lysierten Zielzellen (C) mittels der Formel:

$$\% \text{ Zellyse} = (A - B) \div (C - B) \times 100$$

30 bestimmt.

In parallelen Versuchsansätzen erfolgte die Stimulierung der Splenocyten mit Survivin, MAGE-3 und Muc-1 (Konzentration jeweils 1 mg/ml). Sämtliche anderen Bedingungen in diesen Versuchsansätzen waren identisch mit den
5 vorbeschriebenen Bedingungen.

Beispiel 6: ELISA

MaxiSorb-Platten von Nalgene Nunc International (Nalge, Dänemark) wurden über Nacht
10 bei 4 °C mit 100 µl β -Galactosidase bei einer Konzentration von 100 µg/ml (Antikörper-ELISA) oder mit 50 µl anti-Maus-anti-IFN γ - oder -IL-4- (Cytokin-ELISA) „Capture“-Antikörpern (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei einer Konzentration von 1 µg/ml in Beschichtungspuffer (0,02% NaN_3 , 15 mM Na_2CO_3 , 15 mM NaHCO_3 , pH 9,6) beschichtet. Die Platten wurden dann für 2 Stunden bei 37 °C mit 200 µl of
15 Blockierungspuffer (PBS-0,05% Tween 20-1% BSA) abgesättigt. Nachfolgend wurden sie mit Sera (Antikörper-ELISA) bei 1:10-, 1:30- und 1:90-Verdünnungen in Waschpuffer oder 100 µl des Zellkulturüberstandes (Cytokin-ELISA) für 4 bis 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 100 µl von 1:1.000-Verdünnungen von Ziege-anti-Maus-IgG1 - oder -IgG2a-
20 Antikörpern (Antikörper-ELISA) von Caltag (Burlington, CA, USA) oder 100 µl/Well biotinylierte anti-Maus-anti-IFN - oder -IL-4- (Cytokin-ELISA) Detektions-Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml in Blockierungspuffer hinzugefügt und die Platten 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Für den Cytokin-ELISA wurden nach 3 Waschschritten mit Waschpuffer, 100 µl einer
25 1:1.000-Verdünnung Streptavidin-HRP (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) pro Well hinzugefügt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden pro Well 100 µl ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))-Konzentrat bei einer Konzentration von 300 mg/l in 0,1 M Zitronensäure, pH 4,35) hinzugefügt. Nach weiteren 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurde die Extinktion bei OD_{405} mit einem Sunrise ELISA-Reader von
30 Tecan (Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Mengen der Cytokine wurden anhand einer Standardkurve berechnet, die durch Titrieren bestimmter Mengen rekombinanter Cytokine erstellt wurde (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).

In parallelen Versuchsansätzen wurden die MaxiSorb-Platten mit Survivin, MAGE-3 und Muc-1 (jeweils 100 µl) beschichtet. Sämtliche anderen Bedingungen in diesen parallelen Versuchsansätzen waren mit den vorbeschriebenen Bedingungen identisch.

5 Beispiel 7: Immunisierung von Mäusen mit GM-CSF-RNA (vgl. Fig. 5)

6 bis 12 Wochen alten, weiblichen BALB/c AnNCrIBR (H-2d)-Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) BALB-Mäuse wurden analog zu Beispiel 4 (siehe oben) mit 20 mg Pentobarbital intraperitoneal anästhesiert. Den Mäusen wurden dann intradermal in beide
 10 Ohrmuscheln 25 µg β-Globin-UTR-stabilisierte mRNA, kodierend für β-Galactosidase, die mit Injektionspuffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES) verdünnt wurde, injiziert. Es wurden nachfolgend 50 µg GM-CSF-RNA in die Ohrmuscheln einmal injiziert. Zwei Wochen nach der ersten Injektion wurden die Mäuse unter den gleichen Bedingungen (wie bei der ersten Injektion) behandelt.

15

In parallelen Versuchsansätzen I, II, III, IV und V, die unter den gleichen, vorstehend beschriebenen, Bedingungen, durchgeführt wurden, wurde Mäusen in

- | | | |
|----|----------------------------|--|
| | <u>Versuchsansatz I:</u> | lediglich Injektionspuffer injiziert (Kontrolle); |
| | <u>Versuchsansatz II:</u> | 50 µg GM-CSF-RNA alleine injiziert (Kontrolle); |
| 20 | <u>Versuchsansatz III:</u> | 25 µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, die für β-Galactosidase kodierte, und 50 µg GM-CSF-RNA injiziert, wobei die GM-CSF-RNA 24 Stunden vor der für β-Galactosidase kodierenden β-Globin-UTR-stabilisierten mRNA verabreicht wurde (entsprechend t - 1); |
| 25 | <u>Versuchsansatz V:</u> | 25 µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, die für β-Galactosidase kodierte, und 50 µg GM-CSF-RNA injiziert, wobei die GM-CSF-RNA 2 Stunden vor der für β-Galactosidase kodierenden β-Globin-UTR-stabilisierten mRNA verabreicht wurde (entsprechend t - 0); |
| 30 | <u>Versuchsansatz V</u> | 25 µg β-Globin-UTR-stabilisierter mRNA, die für β-Galactosidase kodierte, und 50 µg GM-CSF-RNA injiziert, wobei die GM-CSF-RNA 24 Stunden nach der für β- |

Galactosidase kodierenden β -Globin-UTR-stabilisierten mRNA verabreicht wurde (entsprechend $t + 1$).

Maxi Sorb-Platten von Nalgene Nunc International (Nalge Dänemark) wurden über Nacht
5 bei 4° C mit 50 ml eines Antimäus-Anti-Interferon- γ (IFN γ)-Antikörpers mit 1 mg/ml in
einem Beschichtungspuffer (0,02% NaN₃, 15mM Na₂CO₃, 15 mM NaHCO₃, pH 6,6)
ausplattiert. Die Platten wurden dann mit 200 ml des Blockierungspuffers (PBS-0,05%
Tween 20-1 % BSA) für 2 Stunden bei 37° C gesättigt und dann mit 100 ml des
Zellkulturüberstands (Cytokine-ELISA) für 4-5 h bei 37° C inkubiert. 100 μ l von 1:1000
10 Verdünnungen von 100 μ l pro Well des biotinylierten Antimäus-Anti-IFN γ -
Detektionsantikörper (Becton Dickinson) wurde bei 0,5 mg/ml in einem Blockierungspuffer
hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit
Waschpuffer, wurde 100 ml einer 1 zu 1000 Verdünnung von Streptavidin-HRP
(Meerrettichperoxidase, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) pro Well hinzugefügt.
15 Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 100 ml pro Well von ABTS (300 mg/l 2,2-
Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) in 0,1 M Citrat, pH 4,35) Substrat
hinzugegeben. Nach 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei
OD405 mit einem Sunrise ELISA-Auslesegerät von Tecan (Crailsheim, Deutschland)
gemessen und die Mengen des Cytokins nach einer Standardkurve, die durch Titrierung mit
20 bestimmten Mengen von rekombinanten Cytokinen erhalten wurde (BD Pharmingen,
Heidelberg, Deutschland), berechnet. Es ist deutlich erkennbar, dass die Immunstimulation
durch Gabe von GM-CSF-mRNA vor, etwa zeitgleich und nach der Injektion von β -
Galactosidase-mRNA deutlich erhöht ist.

Literaturliste

1. Tang,D.C, DeVit,M. & Johnston,S.A. Genetic immunization is a simple
5 method for eliciting an immune response. *Nature*356, 152-154 (1992).
2. UlmerJ.B. *etal.* Heterologous protection against influenza by injection of
DNA encoding a viral protein. *Science*259, 1745-1749 (1993).
3. Wang,B. *etal.* Gene inoculation generates immune responses against human
immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4156-4160
10 (1993).
4. Robinson,H.L, Hunt,LA. & Webster, R.G. Protection against a lethal
influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing
plasmid DNA. *Vaccine* 11, 957-960 (1993).
5. Fynan,E.F. *etal.* DNA vaccines: protective immunizations by parenteral,
15 mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11478-
11482 (1993).
6. UlmerJ.B. An Update on the State of the art of DNA vaccines. *Curr. Opin.*
DrugDiscov. Devel. 4, 192-197 (2001).
7. Donnelly,J., Berry,K. & UlmerJ.B. Technical and regulatory hurdles for DNA
20 vaccines. *IntJ Parasitol.* 33, 457-467 (2003).
8. Klinman,D.M. *etal.* DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer*
Semin. Immunopathol. 19, 245-256 (1997).
9. Gilkeson,G.S., Pippen,A.M. & Pisetsky,D.S. Induction of cross-reactive anti-
dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with
25 bacterial DNA. *J Clin Invest*95, 1398-1402 (1995).

10. Saenz-Badillos J., Amin, S.P. & Granstein, R.D. RNA as a tumor Vaccine: a review of the literature. *Exp Dermatol* 10, 143-154 (2001).
11. Sullenger, B.A. & Gilboa, E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 418, 252-258 (2002).
- 5 12. Nair, S.K. *et al.* Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol* 16, 364-369 (1998).
13. Ying, H. *et al.* Cancer therapy using a self-replicating RNA Vaccine. *Nat Med.* 5, 823-827 (1999).
- 10 14. Schirmacher, V. *et al.* Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine. *Gene Ther.* 7, 1137-1147 (2000).
- 15 15. Martinon, F. *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 23, 1911-1916 (1993).
16. Vassilev, V.B., Gil, L.H. & Donis, R.O. Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhoea virus. *Vaccine* 19, 2012-2019 (2001).
17. Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H.G. & Jung, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J Immunol.* 30, 1-7 (2000).
- 20 18. Granstein, R.D., Ding, W. & Ozawa, H. Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA. *J Invest Dermatol* 114, 632-636 (2000).

19. Iwasaki,A., Stiernholm,B.J., Chan,AX, Berinstein,N.L. & Barber,B.H.
Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding
costimulatory molecules and cytokines. *J Immunol* 158, 4591-4601 (1997).
20. Warren,T.L & Weiner,G.J. Uses of granulocyte-macrophage colony-
stimulating factor in Vaccine development. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 168-173
5 (2000).
21. Scheel,B. *etal.* Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules.
Eur. J. Immunol. 34, 537-547 (2004).
22. Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S. & Reis E Sousa. Innate antiviral
responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.
10 *Science* 303, 1529-1531 (2004).
23. Heil,F. *etal.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like
receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529 (2004).
24. Kwissa,M., Kroger,A., Hauser,H., Reimann,J. & Schirmbeck,R. Cytokine-
facilitated priming of CD8(+) T cell responses by DNA vaccination. *J Mol.*
15 *Med* 81, 91-101 (2003).
25. Cho,J.H., Lee,S.W. & Sung,Y.C. Enhanced cellular immunity to hepatitis C
virus nonstructural proteins by codelivery of granulocyte macrophage-colony
stimulating factor gene in intramuscular DNA immunization. *Vaccine* 17,
20 1136-1144 (1999).
26. Weber,J. *etal.* Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a
multi-peptide Vaccine for resected Stage II melanoma. *Cancer* 97, 186-200
(2003).
27. Kusakabe,K. *etal.* The timing of GM-CSF expression plasmid administration
influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA Vaccine.
25 *J Immunol* 164, 3102-3111 (2000).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Immunstimulation in einem Säugetier umfassend die folgenden Schritte:
 - 5 a. Verabreichen mindestens einer mRNA enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich und
 - b. Verabreichen mindestens einer Komponente mindestens einer der nachfolgend Kategorien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
10 einem Cytokin, einem Cytokin-mRNA, einer adjuvo-viralen mRNA, einer CpG-DNA und einer adjuvanten RNA.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Schritt b. 1 Minute bis 48 Stunden, bevorzugt 20 Minuten bis 36 Stunden, ebenfalls bevorzugt 30 Minuten bis
15 24 Stunden, stärker bevorzugt 10 Stunden bis 30 Stunden, am stärksten bevorzugt 12 Stunden bis 28 Stunden, insbesondere bevorzugt 20 Stunden bis 26 Stunden, nach Schritt a. erfolgt.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei in Schritt a.
20 zusätzlich mindestens ein RNase-Inhibitor, vorzugsweise RNasin oder Aurintricarbonsäure, verabreicht wird.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Immunantwort verstärkt bzw. moduliert wird, vorzugsweise von einer Th2-
25 Immunantwort in eine Th1 -Immunantwort verändert wird.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) einen Bereich enthält, der für mindestens ein Antigen aus einem Tumor ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 707-
30 AP, AFP, ART-4, BAGE, -Catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CMV pp65, CT, Cyp-B, DAM, EGFR1, ELF2M,

ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gpl oo, HAGE, HBS, HER-2/neu, HLA-A*O2O1-R1 7OI, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (oder hTRT), Influenza Matrix-Protein, insbesondere Influenza A-Matrix-M1 -Protein oder Influenza B-Matrix-M1 -Protein, iCE, KIAA0205, LAGE, z.B. LAGE-1, LDLR/FUT, 5 MAGE, z.B. MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, MAGE-A1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-1 0, MART-1/Melan-A, MC1 R, Myosin/m, MUCI, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR, PRAME, Proteinase 3, PSA, PSM, PTPRZ1, RAGE, RU1 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, SEC61 G, SOX9, SPC1, SSX, Survivin, TEL/AML1, TERT, TNC, 10 TPI/m, TRP-I, TRP-2, TRP-2/INT2, Tyrosinase und WTI kodiert.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Cytokin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus IL-1 (α/β), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-1 0, IL-1 2, IL-1 3, IL-1 5, IL-1 8, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , LT- α , MCAF, RANTES, TGF α , TGF β 1, TGF β 2, 15 TNF α , TNF β und besonders bevorzugt G-CSF oder GM-CSF oder M-CSF.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) als nackte oder 20 komplexierte mRNA vorliegt.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) als Globin-UTR (untranslated regions)-stabilisierte mRNA, insbesondere als β -Globin-UTR- 25 stabilisierte mRNA, vorliegt.

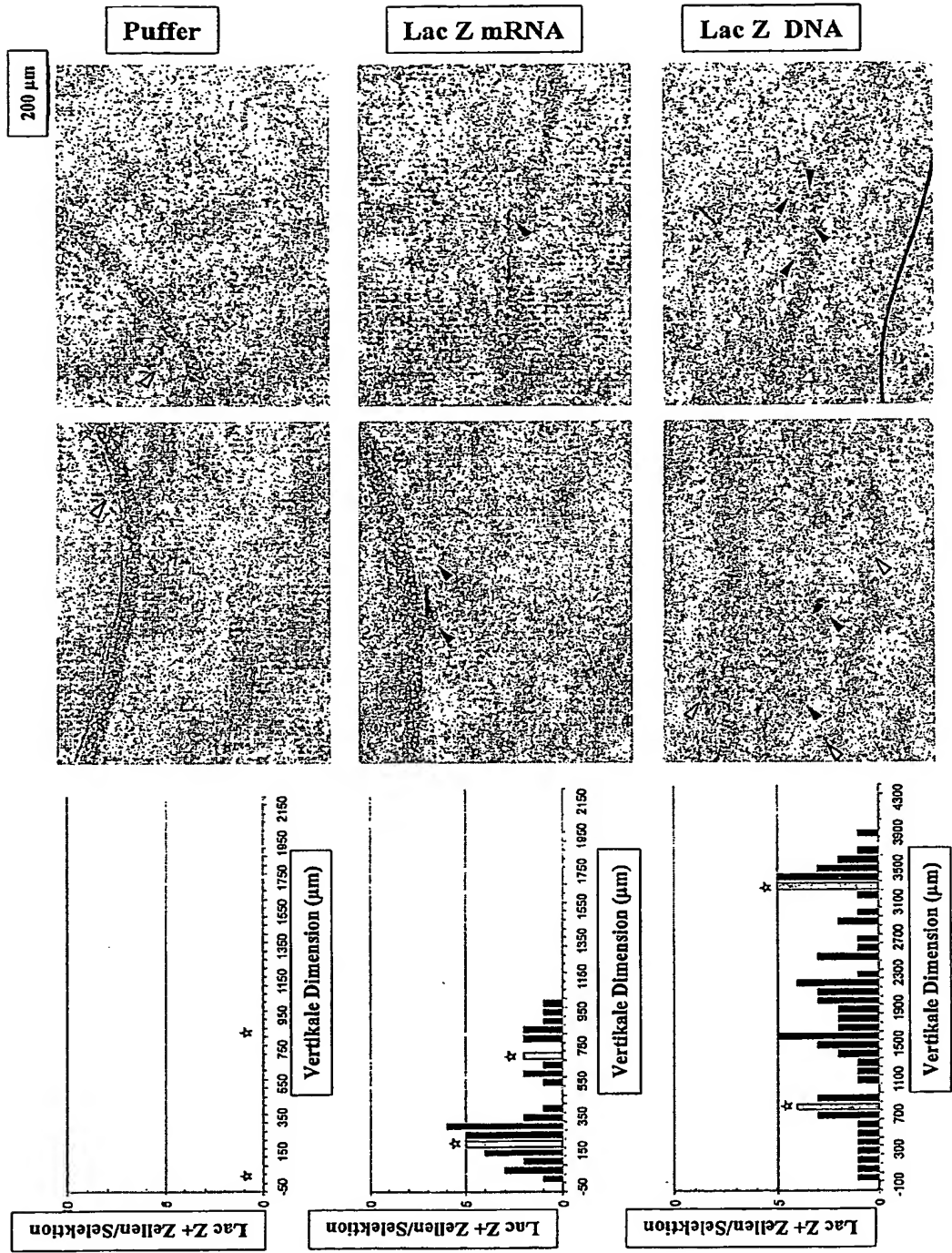
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) als modifizierte mRNA, insbesondere als stabilisierte mRNA, vorliegt. 30

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) gegenüber dem G/C-Gehalt des kodierenden Bereichs der Wildtyp-RNA erhöht ist, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten mRNA gegenüber der kodierten Aminosäuresequenz der Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) gegenüber dem A/U-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle der Wildtyp-mRNA erhöht ist.
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der kodierende Bereich und/oder der 5'- und/oder 3'-nicht-translatierte Bereich der modifizierten mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) gegenüber der Wildtyp-mRNA derart verändert ist, dass er keine destabilisierenden Sequenzelemente enthält, wobei die kodierte Aminosäuresequenz der modifizierten mRNA gegenüber der Wildtyp-mRNA vorzugsweise nicht verändert ist.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) eine 5'-Cap-Struktur und/oder einen Poly(A)-Schwanz, vorzugsweise von mindestens 25 Nukleotiden, stärker bevorzugt von mindestens 50 Nukleotiden, noch stärker bevorzugt von mindestens 70 Nukleotiden, ebenfalls stärker bevorzugt von mindestens 100 Nukleotiden, am stärksten bevorzugt von mindestens 200 Nukleotiden, und/oder mindestens eine IRES und/oder mindestens eine 5'- und/oder 3'-Stabilisierungssequenz aufweist.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) oder die adjuvante RNA aus Schritt (b.) mindestens ein Analoges natürlich vorkommender Nukleotide aufweist.
- 5
15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die modifizierte mRNA aus Schritt (a.) und/oder aus Schritt (b.) oder die adjuvante RNA aus Schritt (b.) mit mindestens einem kationischen oder polykationischen Agens komplexiert oder kondensiert ist.
- 10
16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das kationische oder polykationische Agens ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Protamin, Poly-L-Lysin, Poly-L-Arginin und Histonen.
- 15
17. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche zur Behandlung von Tumorerkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, protozoologischen, viralen und/oder bakteriellen Infektionen.
- 20
18. Erzeugnis, enthaltend mindestens eine mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und mindestens eine Komponente aus mindestens einer der nachfolgenden Kategorien ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Cytokin, einer CpG DNA, einer Cytokin-mRNA, einer adjuvoviralen mRNA und einer adjuvanten RNA, als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung bei der Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, viralen und/oder bakteriellen Infektionen.
- 25

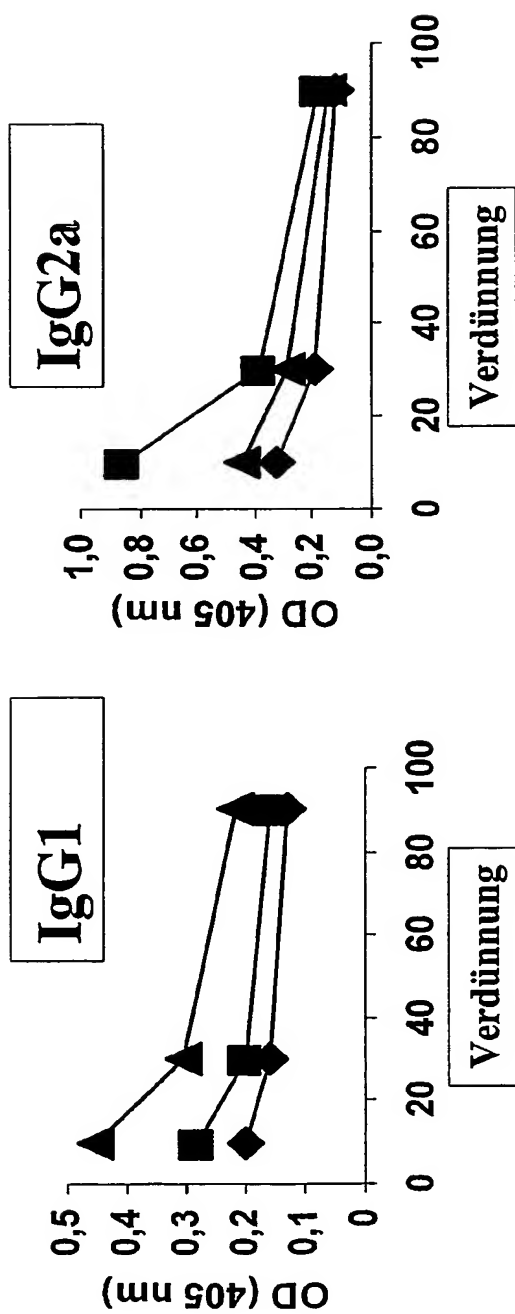
19. Kit, enthaltend mindestens eine mRNA enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und mindestens eine Komponente aus mindestens einer Kategorie ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Cytokin, einer Cytokin-mRNA, einer adjuvo-viralen mRNA, einer CpG DNA mindestens und einer adjuvanten RNA, wobei die mindestens eine mRNA, enthaltend einen für mindestens ein Antigen eines Pathogens oder mindestens ein Tumorantigen kodierenden Bereich, und das mindestens eine Cytokin oder die mindestens eine Cytokin-mRNA oder die mindestens eine CpG DNA oder die mindestens eine adjuvante RNA oder die mindestens eine adjuvo-virale mRNA voneinander getrennt sind.
20. Verwendung des Kits nach Anspruch 19 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, protozoologischen, viralen und/oder bakteriellen Infektionen.

1/7

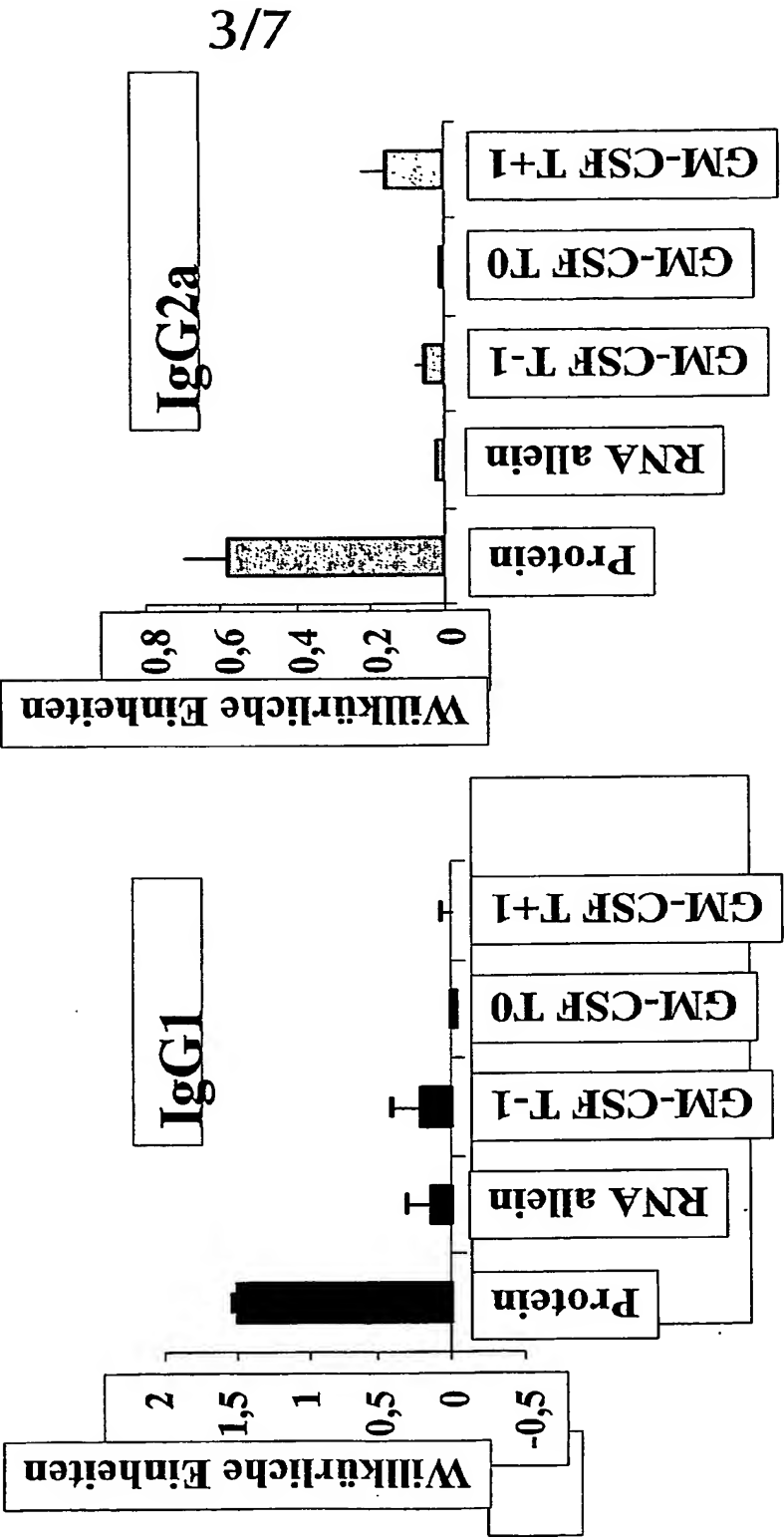


Figur 1

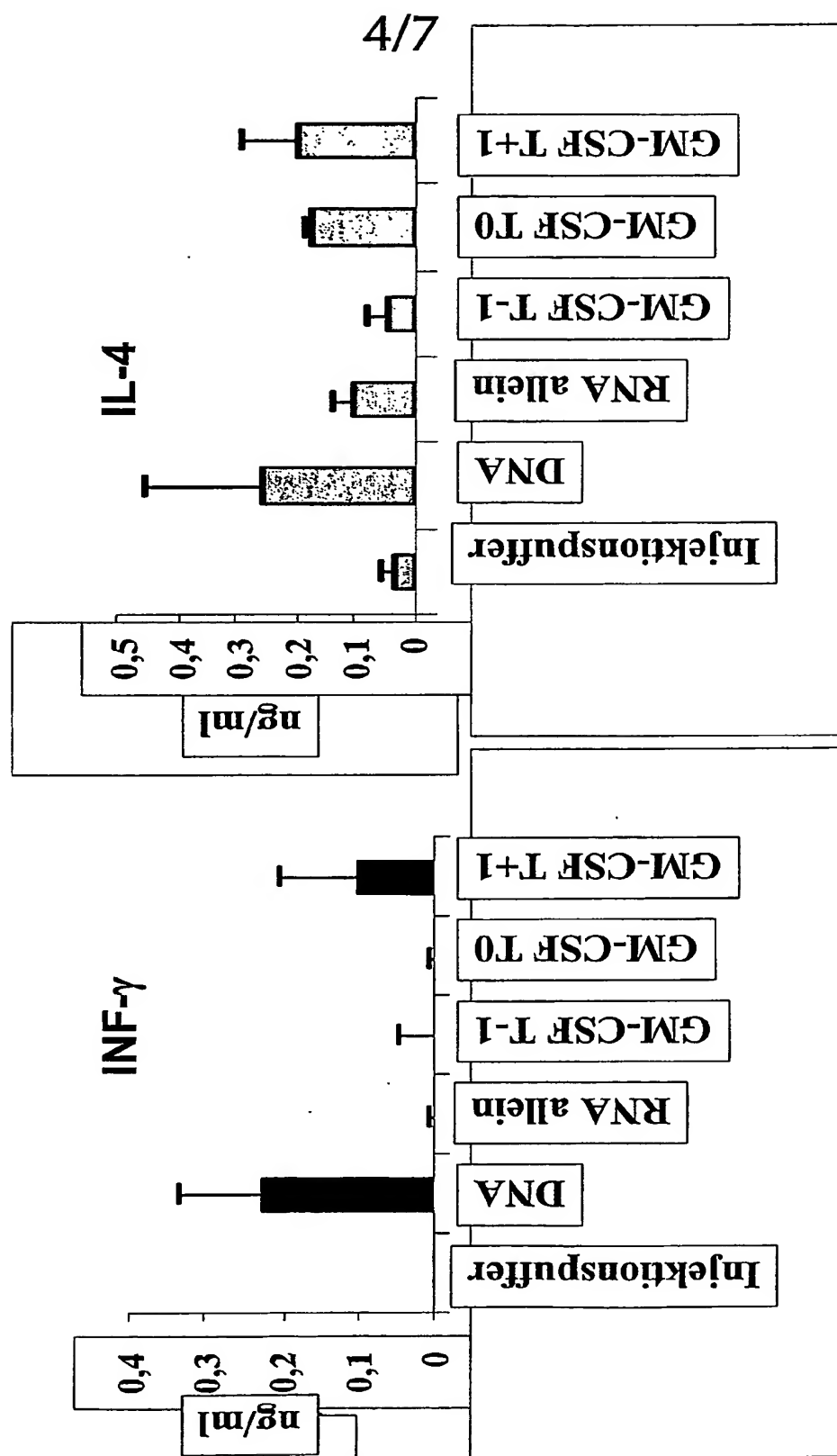
2/7



Figur 2

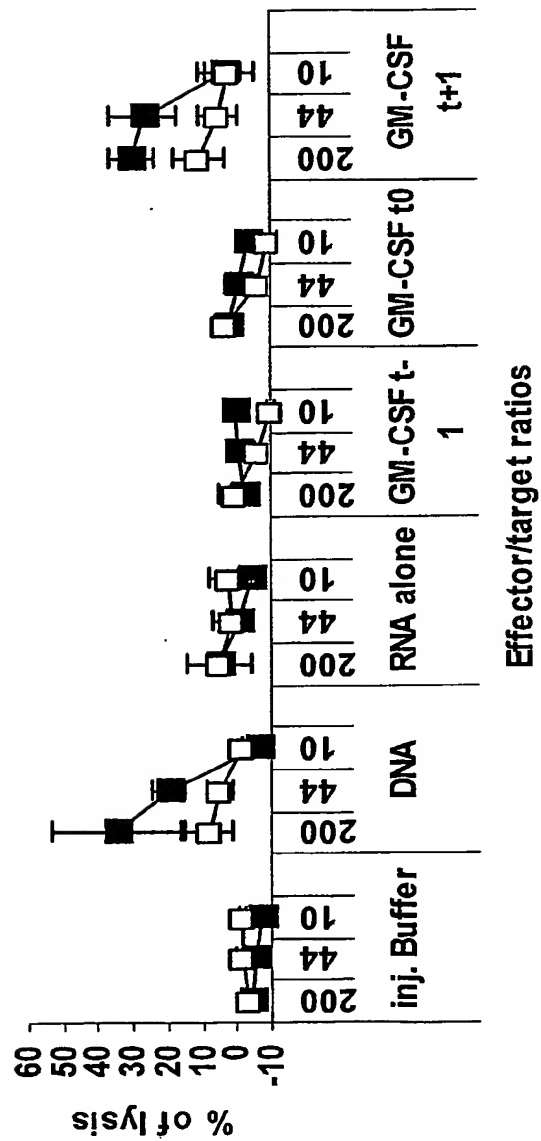


Figur 3a



Figur 3b

5/7



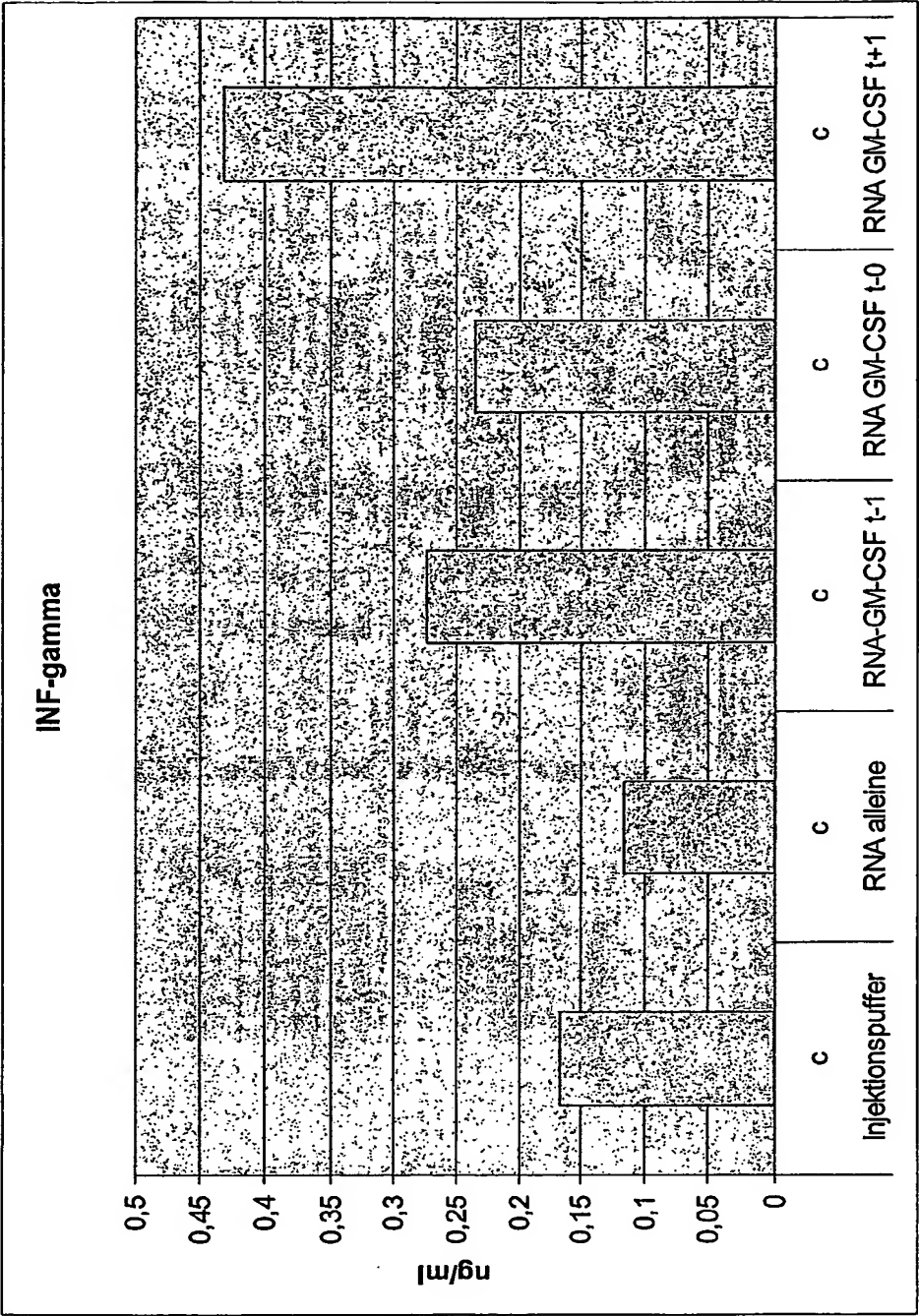
Figur 3c

6/7

	Cytotoxisch e Aktivität	Detektion von IL4	Detektion von Interferon-
DNA-Injektion	3/8	2/8	5/8
mRNA- Injektion	1/12	7/12	0/12
mRNA+GM- CSF t-1	1/9	6/9	3/9
mRNA+GM- CSF t0	3/8	5/8	4/8
mRNA+GM- CSF t+1	8/12	6/12	9/12

Tabelle 1: Gesamtanzahl injizierter Mäuse

Figur 4



Figur 5

SEQUENCE LISTING

<110> CureVac GmbH
<120> Kombinationstherapie zur Immunstimulation
<130> CU01P022WO
<160> 5
<170> Patentin version 3.3

<210> 1
<211> 13
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Kozak sequence (siehe Beschreibung s. 24)

<400> 1
gccgccacca ugg

<210> 2
<211> 15
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> RNA stabilizing sequence (siehe Beschreibung s. 27)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n = c or u

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n = a or g or c or u

<220>
<221> repeat_unit
<222> (5)..(5)
<223> repeat number: x

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) .. (9)
<223> n = u or a

<220>
<221> repeat_unit
<222> (10)..(10)
<223> repeat number: x

<220>
<221> modified_base
<222> (10) ..(10)
<223> n = pyrimidine

13

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) .. (10)

<223> n is a, c, g, or u

<220>

<221> misc_feature

<222> (13) .. (13)

<223> n = c or u

<400> 2

nccanccnn ucncc

15

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Xenopus

<220>

<221> misc_feature

<223> Xenopus beta-globin 5'-Untranslated region (siehe Beschreibung s. 30)

<400> 3

gcttggtctt tttgcagaag ctcagaataa acgctcaact ttggc

45

<210> 4

<211> 157

<212> DNA

<213> Xenopus

<220>

<221> misc_feature

<223> Xenopus beta-Globin 3' nicht translatierte Region ("Untranslated region") (siehe Beschreibung s. 31):

<400> 4

gactgactag gatctgggta ccactaaacc agcctcaaga acacccgaat ggagtctcta 60

agctacataa taccaactta cacttacaaa atgttggtccc ccaaaatgta gccattcgta 120

tctgctccta ataaaaagaa agtttcttca cattcta 157

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> human alpha-Globin nicht translatierte Region: (siehe Beschreibung s. 31):

<400> 5

ctagtgactg atagcccgct gggcctccca acgggcctc ctcccctc

48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/009383

A. CLASSIFICATION OF THE INVENTION
A61K39/39 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national Classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (Classification system followed by Classification Symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	WO 03/051401 A (CUREVAC GMBH; HOERR, INGMAR; VON DER MUELBE, FLORIAN; PASCOLO, STEVE) 26 June 2003 (2003-06-26) *das ganze Dokument, im besonderen: Seite 11, dritter Absatz-Seitel3; Seite 16 2. und 3. Absatz; Figl, Fig. 7, Ansprüche 1,11,12,16,17*	1-20
A	MCKENZIE B S ET AL: "Nucleic acid vaccines" IMMUNOLOGIC RESEARCH, KARGER, BASEL, CH, vol. 24, no. 3, 2001, pages 225-244, XP002968550 ISSN: 0257-277X page 231, column 2, paragraph 3 - page 232 V-	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

'E' earlier document but published on or after the international filing date

'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 January 2006

Date of mailing of the international search report

19/01/2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krueger, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/009383

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2004/092329 A (GALENICA PHARMACEUTICALS, INC; MARCIANI, DANTE, J) 28 October 2004 (2004-10-28) paragraphs '0017!', '0073! -----	1, 19, 20
X	SCHIRRMACHER V ET AL: "Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine" GENE THERAPY, vol. 7, no. 13, July 2000 (2000-07), pages 1137-1147, XP002359468 ISSN: 0969-7128 *Zusammenfassung und Seite 1141, letzter Absatz-Seite 1142 erster Absatz* -----	1, 3, 4, 6, 7, 19, 20
X	CHENG W F ET AL: "Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA Vaccine potency by linkage of mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 gene to an antigen gene" JOURNAL OF IMMUNOLOGY., THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 166, 2001, pages 6218-6226, XP002955131 ISSN: 0022-1767 *Zusammenfassung, Abbildungen 1, 9* -----	1, 19, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/009383

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-17 and 20 relate to a method for treatment of the human or animal body (PCT Article 52(4) EPC), the search was carried out and was based on the stated effects of the Compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without it being justified by an additional fee, the Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. :

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2005/009383

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03051401	A	26-06-2003	AU 2002360055 A1	30-06-2003
			CA 2473135 A1	26-06-2003
			DE 10162480 A1	07-08-2003
			EP 1458410 A2	22-09-2004
			US 2005059624 A1	17-03-2005
WO 2004092329	A	28-10-2004	CA 2522213 A1	28-10-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/009383

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
A61K39/39 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ⁰	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/051401 A (CUREVAC GMBH; HOERR, INGMAR; VON DER MUELBE, FLORIAN; PASCOLO, STEVE) 26. Juni 2003 (2003-06-26) *das ganze Dokument, im besonderen: Seite 11, dritter Absatz-Seitel3; Seite 16 2. und 3. Absatz; Fig1, Fig. 7, Ansprüche 1,11,12,16,17*	1-20
A	MCKENZIE B S ET AL: "Nucleic acid vaccines" IMMUNOLOGIC RESEARCH, KARGER, BASEL, CH, Bd. 24, Nr. 3, 2001, Seiten 225-244, XP002968550 ISSN: 0257-277X Seite 231, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 232 -/-	1-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen in Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Januar 2006

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/01/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-20 40, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krueger, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/009383

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ⁰	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
x,P	WO 2004/092329 A (GALENICA PHARMACEUTICALS, INC; MARCIANI, DANTE, J) 28. Oktober 2004 (2004-10-28) Absätze '0017!, '0073!	1,19,20
X	SCHIRRMACHER V ET AL: "Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine" GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 13, Outil 2000 (2000-07), Seiten 1137-1147, XP002359468 ISSN: 0969-7128 *Zusammenfassung und Seite 1141, letzter Absatz-Seite 1142 erster Absatz*	1,3,4,6, 7,19,20
X	CHENG W F ET AL: "Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA Vaccine potency by linkage of mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 gene to an antigen gene" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, Bd. 166, 2001, Seiten 6218-6226, XP002955131 ISSN: 0022-1767 *Zusammenfassung, Abbildungen 1,9*	1,19,20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/009383

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-17 und 20 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2005/009383

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03051401 A	26-06-2003	AU 2002360055 A1	30-06-2003
		CA 2473135 A1	26-06-2003
		DE 10162480 A1	07-08-2003
		EP 1458410 A2	22-09-2004
		US 2005059624 A1	17-03-2005
WO 2004092329 A	28-10-2004	CA 2522213 A1	28-10-2004

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.